課題名	B-0806 擬似分子鋳型を用いた環境汚染物質の選択的捕捉技術の開発
課題代表者名	細矢 憲 （京都府立大学 大学院生命環境科学研究科 教授）
研究実施期間	平成20～24年度
累計予算額	累計予算額 78,680千円（うち24年度14,400千円） 予算額は，間接経費を含む。 平成20年度はナノテクノロジーを活用した環境技術開発推進事業予算にて実施
本研究のキーワード（5～10個以下程度）	カラムスイッチング，自動濃縮，環境化学物質，計測技術，高速液体クロマトグラフィー，擬似分子鋳型，官能基間距離固定，ポリ塩素化ビフェニル，医薬品及びパーソナルケア製品，スポンジモノリス

研究体制

（１）高感度分析システムの実用化に関する研究（京都府立大学，京都大学，（株）島津製作所）

（２）高選択性分離膜の開発と実用化に関する研究（京都府立大学，京都大学，（株）カネカ）

研究概要

１．はじめに（研究背景等）

微量の環境化学物質を定量分析する際には，濃縮操作が不可欠になる。しかし，用手法による現在の環境水試料前処理では，再現性不良，煩雑な処理がもたらす非効率さなどの問題がある。そのため，吸着選択性の大きな前処理媒体を，オンラインで高速液体クロマトグラフ（HPLC）などの分析機器と接続することにより，これらの問題点を大幅に改善する新規システムの開発が求められている。実際，オンサイトの分析者からも同様な希望，提言を聞くことは稀ではない。定量分析すべき微量化学物質の濃度は1 ng/L程度の低濃度であることもしばしばである。このような要求に対応できる分析システムとその手法を一般化し提供することには，社会的意義があると考えられる。

排水中の汚染物質は河川や湖沼等に流入する際に除去することが望ましいとされるが，既存の分離・吸着剤では，通水性あるいは吸着選択性の観点から，効率的な除去が不完全で，既存品に替わる高通水性を有した新たな分離・吸着剤が求められている。

また，現在特定の分子を選択的に吸着する方法として，分子インプリント法と呼ばれる分子鋳型法が注目されているが，いくつかの問題点があるため，多くの環境汚染物質に従来の分子インプリント法を直接適用することは困難である。そこで，これらの問題点を克服する応用技術が求められている。

さらに，ポリ塩素化ビフェニル(PCB)やダイオキシン類などの，塩素を含む芳香族化合物の一般的な分析前処理法であるジメチルスルホキシド（DMSO）処理は，煩雑な操作を伴う場合があり，これに代わる効率的な前処理が求められている。

以上のことから，上述のモニタリングを目的とした高感度分析システムの開発に加え，下水処理施設等の最終排水地点での上記汚染物質の選択的，効率的な除去を可能とする，新規高通水性分離媒体（膜）の開発が求められている。

２．研究開発目的

高感度分析システムの実用化のために，環境水試料の前処理に有効な前処理カラムを組み込んだカラムスイッチングHPLCの構築，同システムの基本性能および，河川水等実試料分析への適応性の確認，前処理カラムを含む同システムの実用に必要な技術開発と製品化を最終の目的とした。

さらに本研究では，環境汚染物質の効率的な除去のための新規分離膜開発を目指し，分子インプリント法に基づく種々の応用技術を新たに創成することで，物理的・化学的性質の異なる種々の難捕捉有機分子と難捕捉親水性物質を選択的に吸着・分離する新規分子認識材料，高通水性分離材料およびそれらのハイブリッド膜の開発を目的とした。

3. 研究開発の方法

(1)高感度分析システムの実用化に関する研究

メタクリル酸スルホプロピルカリウム塩(MASK)を表面修飾したポリマー粒子を充てんした前処理カラムを用いて，カラムスイッチングHPLCシステムの信頼性，耐久性向上のために必要な流路構成(多バルブ化による洗浄，流路の構成及び最適化など)，および汎用的な前処理手順を最適化した。次に河川水にいくつかの化学物質を添加した試料を用い，組み合わせる検出方法として，紫外-可視吸光検出器，蛍光検出器，質量分析計(MS)などの検出器を用いて実用的な定量分析に必要な，再現性，直線性，回収率，耐久性などの諸元性能評価を行った。さらにバルブ操作等を容易に行うために専用ソフトウエアの開発を行い，市販化および普及に必要な資料類を整えた。

(2)高選択性分離膜の開発と実用化に関する研究

1)難捕捉有機分子に対する疑似分子鋳型

a. 揮発性有機化合物の選択的吸着に関する研究

本検討では，まず，架橋剤としてエチレングリコールジメタクリレート (EDMA)，多孔質化溶媒としてベンゼン，トルエン，クロロホルムを用い，バルク重合法により目的とするポリマーを合成した。また，機能性モノマーとしてメタクリル酸(MAA)，鋳型分子としてピリジンを用いて作製した分子インプリントポリマー(Gas-MIP)も同様の方法で合成した。合成したポリマーの評価として，窒素吸着法を用いた比表面積の算出，および単一ガス，混合ガス中でのガス吸着評価を行い，各ポリマーにおけるインプリント効果を検討した。

b. スポンジモノリスの調製と保持特性

基材ポリマー(エチレン-酢酸ビニル共重合体，EVA)とペンタエリスリトール(孔形鋳型)を130 ℃で熱溶解・混練した後，押出加工により円柱状にし，スポンジモノリス(SPM)を作製した。加水分解SPM(EVA25-HYDと表記)は6 M NaOH水溶液/メタノール混合溶媒中70 °Cで24時間加熱することで調製した。カチオン交換型SPM(EVA25-HYD-SC)は，EVA25-HYDを無水アセトニトリル中，トリエチルアミン存在下でコハク酸クロリドを24時間室温で反応させ，調製した。アニオン交換型SPM(EVA-HYD-DEA)は，EVA25-HYDをジメチルホルムアミド中，ピリジン存在下でアクリル酸クロライドと48時間60 °Cで反応後，洗浄・乾燥した後，さらにジエチルアミン中，室温で72時間反応させて調製した。酢酸ビニル含量15%及び25%のSPM(EVA15，EVA25と表記)，低密度ポリエチレン(PE)，メタクリレート系ポリマー充てん剤(EDMA，グリセリンジメタクリレート;GDMA)及びシリカゲルC_{18}充てん剤を内径4.6 mm，長さ100 mmのカラムに充てんし，HPLCにより評価した。SPMのクロマトグラフィー特性は極性や立体構造に特徴のある溶質の保持挙動及びシリカゲルC_{18}カラムの評価に用いられる分析条件により，分離剤の疎水性，立体選択性及び水素結合性等を評価した。

c. PCBの選択的分離を目的としたスルホキシド含有型分子インプリント固相剤の開発 ～油中PCBの捕捉について～

固相剤の合成については，基材となる架橋剤の選定，分子インプリント効果を発現させる多孔質溶媒の選定，スルホキシドの導入手法を考慮し，実施した。

合成検討に際して使用した試薬は，重合開始剤として2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)(ADVN)，多孔質化溶媒としてキシレン(3異性体混合品)，ペンタメチルベンゼン(PMB)，ジクロロベンゼン(1,3-DB)，トリクロロベンゼン(1,3,5-TB)，架橋剤として，ジビニルベンゼン (DVB)，GDMA，EDMA，機能性モノマーとして，クロロメチルスチレン(CMS)，フェニルビニルスルホキシド(PVS)を用いた。

まず，最初に3種類のモノマーと2種類の多孔質化溶媒を用いて基材ポリマーの合成を行った。次に，DMSOに分級した基材ポリマーを加え反応させた後，チオフェノールを加えた後に酸化し，スルホキシド固相ポリマーを得た。得られたポリマーをポリプロピレン製カートリッジに充てんし，分画試験を行った。また，基材ポリマーの合成時に，スルホキシドを有するモノマーと同時に共重合する方法で作製したポリマーについても検討を行った。

2)難捕捉親水性物質に対する疑似分子鋳型

d. 親水性化合物のためのトラップ層開発の検討

本検討ではまず，モノマーにGDMAを用い，多段階膨潤重合法により粒子径均一ポリマーを調製し，さらにその表面を機能性モノマーを用いて修飾した。調製したポリマーは，HPLC用カラムに充てんし，その保持特性を評価した。

e. 官能基間距離認識による高親水性化合物の選択的分離に関する研究

本検討では，様々な鋳型分子を用いて，多段階膨潤重合法により粒子径均一ポリマーを調製した。調製したポリマーをHPLC用カラムの充てん剤として評価することで，鋳型分子に対する選択的認識能を比較した。また，サキシトキシン（STX）に対する認識能を評価するために，無毒のSTX同族体（デカルバモイルSTX，dcSTX）を用いてバッチ吸着実験を行った。

f. 残留医薬品の分析前処理を目的とした分子鋳型の開発

基材ポリマーとして，EDMAのみをモノマーとして用いたポリマー粒子を合成した。メトクロプラミド用分離剤に関しては，共重合により得られたポリマー粒子を合成した。また，スルピリドに対しては，EDMA粒子5.25 gに対して，テトラブチルアンモニウムクロリド(TBA，2 mmol)もしくは4,4’-ビス-(トリブチルアンモニウムメチルクロリド)ビフェニル(BTAB，1 mmol)と*p*-スチレンスルホン酸（SSA)のイオン結合型錯体を反応させ，距離固定型の分子鋳型，MIP-Iおよび非距離固定型のNIP-Iを得た。得られた分子鋳型をカラムに充てんし，HPLC評価およびオンラインカラムスイッチングシステムの前処理カラムとしての可能性を評価した。

g. 光触媒ハイブリッド分子認識材料による高親水性化合物の選択的吸着・分解に関する研究

本研究では，酸化チタン（P25）表面に化学的修飾を施すことで，イオン性官能基の修飾を試みた。評価として，まず，メチレンブルー（MB）に対する吸着・分解性能および修飾部位の光安定性を評価した。さらに，擬似環境水中でのSTXsに対する選択的吸着能および分解性能を評価した。

h. 多孔性膜と分子鋳型のハイブリッド化技術に関する検討

EDMA，MAA，4-ビニルピリジン（4Vp），多孔質化溶媒として，トルエンを用いて多段階膨潤重合法によりポリマー粒子を合成した。また，スルホ基含有のポリマー粒子について，EDMAのみで合成した基材粒子をメタノール中に分散し，SSAをTBA錯体化状態で混合し，開始剤と共に70 °Cで反応させることで，粒子を得た。ハイブリッド体の合成は，EVA，孔形剤（ペンタエリスリトール），孔径助剤，および粒子を混合し，150 °Cで熱混練し，その後，130 °Cで外径4.8 mmとなるように射出成型した。また，得られたスポンジモノリスおよびハイブリッド体は，水中での超音波洗浄による孔形剤除去の後，メタノールで超音波洗浄し，走査型電子顕微鏡（SEM)を用いて，表面観察した。さらに，合成したハイブリッド体は，4.6 mm内径のカラムに充てんし，HPLCにより評価した。同様に，ポリウレタン等の他の基材についても評価を行った。

i. 距離認識を利用した伸縮性ヒドロゲルの開発とタンパク質の選択的吸着に関する研究

架橋剤としてエチレンオキシドユニット数の異なるポリエチレングリコールジメタクリレート（PEG-DMA），機能性モノマーとしてSSAを用いて，組成の異なる種々のPEGゲルを合成した。合成したPEGゲルの評価として，平衡吸水量（単位質量当りの吸水量），および種々の溶液に対する相対膨張率を評価した。さらに，鋳型分子を導入して合成したPEGゲルにおける，分子認識に対するゲルの膨潤・収縮挙動と選択的吸着性能を評価した。

4. 結果及び考察

（1）高感度分析システムの実用化に関する研究

MASK修飾型充てん剤を前処理剤として用いることで，環境水試料中のフミン質を有効に除去できることを確認した。これによりMS感度の大幅な向上，分析カラムの耐久性向上が確認できた。切換バルブは1-3個でそれぞれの特長を比較し，実用性を考慮して，前処理流路の洗浄，置換機能を強化した2バルブシステムの作動手順を最適化した。これを環境化学物質であるビスフェノールA，17β-エストラジオール，さらには多環芳香族炭化水素（PAHs）の分析に適応し，ng/Lレベルの検出限界など，目的とする良好な性能を得た。これより，環境水試料中の微量化学物質の定量分析には，HPLCを基本にしたカラムスイッチングシステムによる自動濃縮分析が有効であることが確認できた。さらに煩雑なバルブ切換プログラムを対話形式で作成できる専用ソウトウエアの開発に成功し，周辺資料を整え，平成25年初頭より市販化した。

（2）高選択性分離膜の開発と実用化に関する研究

1）難捕捉有機分子に対する疑似分子鋳型

a. 揮発性有機化合物の選択的吸着に関する研究

まず，合成したポリマーの比表面積を測定した結果，各ポリマーの比表面積は溶媒のオクタノール-水分配係数log P_{ow}と架橋剤のlog P_{ow}に依存していることが示され，両者のlog P_{ow}が近いほど比表面積が大きくなることが示唆された。次に，ターゲット化合物を合成時の多孔質化溶媒として用いた場合，得られたポリマーは合成時の

多孔質化溶媒に対して選択的吸着を示すことが示唆された。さらに，混合ガスを用いた場合にも同様の効果が得られた。加えて，機能性モノマー，鋳型分子を加えたGas-MIPの吸着性能を評価した結果，溶媒インプリント効果，機能性モノマーの効果および鋳型分子の効果が観察され，分子インプリント法がガス状物質にも有効であることが示された。

b. スポンジモノリスの調製と保持特性

HPLC評価の結果，SPMは立体的な分子を排除し，平面状疎水分子に対する保持選択性を持つことが明らかとなった。また，極性基を持つ芳香族の保持特性を検討したところ， SPMは極性物質の保持が特徴的に小さく，既存のポリマー系分離剤とは異なる分離選択性を示した。次に，SPMを実試料分析に用いたところ，高流速下において竹酢液中のベンツ[a]ピレンの効率的な濃縮・定量が可能となった。また，SPMを生体試料の分離に適用したところ，夾雑物の吸着による分離性能低下が少なく，既存分離剤では実行困難な血清試料の直接分析やタンパク試料の分離が可能であった。さらに，化学修飾SPMは，環境ならびに生体試料の分離において，高い通液性を確保した選択的濃縮機能を持つ分離剤であることを確認した。

c. PCBの選択的分離を目的としたスルホキシド含有型分子インプリント固相剤の開発
～油中PCBの捕捉について～

基材ポリマーにEDMAを用いることで，DMSO型シリカゲルを用いる従来法とは異なる溶出パターンが現れた。EDMAはインプリント効果が出やすく，平面認識が良好であった。これは，絶縁油（今回は鉱油，直鎖脂肪族）と芳香族環を持つPCBとの間で保持の差が起きたからであると考えられる。また，スルホキシドを導入していないポリマーでも，分子鋳型としたキシレンに対する保持が高くなった。スルホキシドを導入したポリマーについては，特定の異性体に対する高い保持が確認され，EDMAポリマーではその傾向が特に強く発現した。これらの結果より，多孔質化溶媒としてのキシレン，機能性モノマーとしてのスルホキシドにより，インプリント効果による選択的分離が確認された。本検討の結果より，スルホキシドを用いる分子インプリント型固相剤が，PCBの選択的分離に寄与することが期待できる。

2）難捕捉親水性物質に対する疑似分子鋳型
d. 親水性化合物のためのトラップ層開発の検討

調製したポリマー粒子を充てんしたカラムにおける，移動相中のアセトニトリル比を変化させた時の一置換ベンゼンに対する保持変化をHPLCを用いて評価した。未修飾GDMA粒子充てんカラムでは，移動相中のアセトニトリル比の増加に伴い，全ての溶質の保持が順に減少した。しかし，機能性モノマーを用いて表面修飾したGDMA粒子充てんカラムでは，アセトニトリル比が90－100%で，ヒドロキシル基とカルボキシル基を含む溶質に対する保持が増加し，親水性物質に対する新たな濃縮方法の基礎を得た。

e. 官能基間距離認識による高親水性化合物の選択的分離に関する研究

HPLCを用いて，鋳型分子に対する選択的認識能を比較した。まず，試料としてアルキルアンモニウム基を1つ有する化合物を注入した場合，全てのポリマーにおいて，保持特性に大きな差は見られなかった。次に，アルキルアンモニウム基を2つ有する化合物を注入した場合，同等の官能基間距離を有するポリマーにおいて高い保持性能が得られた。これらの結果から，各ポリマーにおいて，各々の官能基間距離を選択的に認識する分子認識場が構築されていると考えられた。次にdcSTXに対するバッチ吸着実験を行った結果，dcSTXと同等の距離を持つポリマーにおいて高い吸着が見られ，dcSTXに対する選択的な認識能の発現が示唆された。

f. 残留医薬品の分析前処理を目的とした分子鋳型の開発

メトクロプラミド用分離剤に関しては，HPLC評価においてある程度の選択的分離能を確認できたが，pK_aの問題から，水系での選択的濃縮が困難であった。

スルピリド用分離剤では，HPLCによる分析結果から，MIP-Iでは官能基間距離認識に基づく高い選択的保持が見られた。さらに，非緩衝液，非水系溶媒中ではスルピリドの保持が大きく，溶出しないことから，潜在的には極めて高いスルピリドに対する保持能を有することが示唆された。

また，オンラインカラムスイッチングシステムにおいて，前処理カラム部にMIP-I充てんカラムを用いてスルピリド水溶液の濃縮を行った。検出器にMSを導入することで，ppt（ng/L）レベルの濃縮・定量を試みた。本検討では，スルピリド標準品を用いて，前処理段階におけるアセトニトリルによる洗浄工程を含む前処理を施し，定量性を検証した。その結果，オンラインSPE-HPLC-MSにおいてスルピリドの濃縮が達成され，10 pptスルピリド水溶液

を用いた場合の回収率は89%となった。これらの結果から，官能基間距離固定化法により合成したMIP-Iがスルピリドの分析前処理と定量分析に実用的に利用可能なことが明らかとなった。

さらに，同システムを用いて実試料（西高瀬川，京都市）中のスルピリド分析を行った結果，約90 pptのスルピリドが検出され，本手法が実試料の定量分析法としても有効であることを実証した。

g. 光触媒ハイブリッド分子認識材料による高親水性化合物の選択的吸着・分解に関する研究

まず，MBに対する吸着・分解性能を評価した結果，ハイブリッド材料はP25に比べ，MBを効果的に吸着することが示された。また，UV照射によって，MBが分解され，酸化チタンとしての分解機能を失っていないことも示された。加えて，修飾した部位が光化学的に安定であることが示された。さらに，夾雑成分下で微量のSTXsを用いた分解実験においても，ハイブリッド材料がSTXsを効果的に吸着し，速やかに分解することが観察され，官能基間距離固定化法が無機材料の酸化チタンにも適用可能であることが示唆された。

h. 多孔性膜と分子鋳型のハイブリッド化技術に関する検討

SEMを用いてハイブリッド体の表面を観察した結果，同時に評価した多孔性材料の中で，EVA基材のハイブリッド体のみが吸着性を有することがわかった。さらに，EVAハイブリッド体では，メタクリレート系の粒子のみがEVA骨格の細孔表面に固定化されていることがわかった。これらの結果から，EVAとポリマー粒子の親和性が寄与しており，メタクリレート系樹脂がハイブリッド体合成に好適であることが示唆された。

また，MAA，4Vpを用いて合成したハイブリッド体について，ポリマー粒子の仕込み比が異なるハイブリッド体を使用し，仕込み比に対する吸着選択性を観察した。その結果，MAA，4Vpいずれのハイブリッド体においても，合成時の配合比の増加に伴い，相対する溶質の保持が増加していることが示された。この保持の増加の定量性について，仕込み時のポリマー粒子量比に対する保持係数のプロットはいずれのハイブリッド体においても，直線的な結果を示し，相関係数が0.99以上となったことから，イオン交換能が定量的にハイブリッド化されたと考えられる。

さらに，流速を変化させた時の保持変化を評価した結果，高流速下でも保持力の変化はほとんど見られないことから，得られたハイブリッド体は，通水性とイオン交換能を維持したままであることが示唆された。

i. 距離認識を利用した伸縮性ヒドロゲルの開発とタンパク質の選択的吸着に関する研究

合成したPEGゲルの平衡吸水量を評価した結果，架橋剤のエチレンオキシドユニット数が低くなるにつれて，また，架橋剤に対して機能性モノマー率が高くなるにつれて，PEGゲルの平衡吸水量は増加した。また，機能性モノマーの種類や全体積に占めるモノマーの割合，多孔質化溶媒を変えることで，PEGゲルの平衡吸水量を制御できることも示された。さらに，イオン性化合物に対する相対膨張率を評価した結果，酸，塩基，アニオン性化合物，一官能のカチオン性化合物と比較して，二官能のカチオン性化合物に対して，相対膨張率は大きく低下することが示された。これは，ゲル中のイオン基間の斥力の抑制に加えて，溶質の2つのイオン基がゲル骨格内の対イオン基を引き寄せるため，溶質のイオン基の距離に基づく収縮が起きたと考えられる。さらに，PEGゲル合成時に鋳型分子としてタンパク質を導入することによって，分子インプリント効果に基づく選択的吸着性能の発現，およびPEGゲルの特異的な収縮が観察された。

5．本研究により得られた主な成果

（1）科学的意義

カラムスイッチングシステムの構築により，これまで長時間と煩雑な手間を要し，再現性の悪い環境水試料中の微量化学物質の定量分析が，極めて簡便に，且つ短時間で精度よく実施できるようになった。また，その手法を一般化，市販化するまでに至り，本研究で得られた成果がすでに社会還元寄与したと言える。さらに，この手法は，環境水以外にも，上水中の規制化学物質の定量分析等への応用も期待できる。

次に，これまで分子インプリント法の適用が困難であったガス状物質，親水性化合物，タンパク質の選択的吸着に成功した。これにより，物理的・化学的性質の異なる種々の環境汚染物質を選択的に吸着できる機能性材料開発の可能性を見出し，効率的な環境汚染物質除去技術開発に貢献した。特に，「疑似分子鋳型」を用いることで，目的物質の効率的な分離濃縮が達成できた。このことから，方法論としての科学的意義は高いと考えられる。また，官能基間距離固定化法は，2つ以上の親水性官能基を有する物質に対して有効であるため，その一般性も高いと判断できる。

また，SPMにより，新しい分離選択性や選択的濃縮機能を付与し，同時に通液性を大幅に改善した分離剤を創成した。その特性を利用し，環境分野や生体分野への分析化学的な貢献が期待される。また，SPMと機能性

のポリマー粒子とのハイブリッド膜は，高通水性を維持したまま粒子の機能を発現することが明らかとなった。この分子鋳型ハイブリッド膜は，高通水性かつ分子選択的な捕捉を可能とする新規分離膜として期待できる。

さらに，PCBやダイオキシン類のような多くの同族体を含む有機塩素化合物について，分子インプリント型固相カラムを用いることで選択的分離精製が可能となった。これまで，同類の研究成果は報告されておらず，さらなる研究の推進によって，本研究で得られた成果がPCB等の分離剤として利用されることが期待できる。

(2)環境政策への貢献

＜行政が既に活用した成果＞

特に記載すべき事項はないが，アプローチを進めている。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

アメリカ合衆国環境保護庁(EPA)も医薬品及びパーソナルケア製品(PPCP)の生態系への影響を懸念しており，継続的なモニタリングが今後求められる。その際，分析前処理における定量分析の高効率化は非常に重要であり，本課題の成果が環境モニタリングの低コスト化，自動化に寄与すると期待できるため，今後の環境政策に貢献できると予想される。特に環境水試料の前処理/分析の方法としてポンプ濃縮によるカラムスイッチング分析の公定法，通知法などへの適用が期待できる。つまり，広範囲に応用可能なプラットフォームを提供したことになる。

また，本研究で開発した分子認識技術を利用することで，これまで選択的吸着・分離が困難であった種々の環境汚染物質の定量分析や効率的な除去が可能になると考えられる。さらに，その他の材料との複合化技術を用いることで，工場排水，病院等の排水源で新たな浄化材として環境政策に貢献すると期待できる。

6．研究成果の主な発表状況

(1)主な誌上発表

＜査読付き論文＞

1) Selective Adsorption of Water-soluble Ionic Compounds by Interval Immobilization Technique Based on Molecular Imprinting
T. Kubo, Y. Tominaga, F. Watanabe, K. Kaya, K. Hosoya, *Anal. Sci.*, 24, 1633-1636, 2008

2) High Throughput On-line Preconcentration Using ‘‘Spongy-monolith’’ Prepared by Pore Templates
T. Kubo, F. Watanabe, K. Kaya, K. Hosoya, *Chem. Lett.*, 37, 950-951, 2008

3) 多バルブカラムスイッチング液体クロマトグラフィー/質量分析計を用いる河川水中ビスフェノール A および 17β－エストラジオール分析における前処理の自動化
小倉泰朗，渡部悦幸，藤田登美雄，細矢憲，久保拓也，彼谷邦光，*分析化学*，58，293-299，2009

4) Effective Recognition on the Surface of a Polymer Prepared by Molecular Imprinting Using Ionic Complex
Y. Tominaga, T. Kubo, K. Kaya, K. Hosoya, *Macromolecules*, 42, 2911-2915, 2009

5) Novel Separation Medium Spongy Monolith for High Throughput Analyses
F. Watanabe, T. Kubo, K. Kaya, K. Hosoya, *J. Chromatogr. A*, 1216, 7402-7408, 2009

6) Surface Modification of TiO2 for Selective Photodegradation of Toxic Compounds
Y. Tominaga, T. Kubo, K. Hosoya, *Catal. Commun.*, 12, 785-789, 2011

7) Retention Properties of Macroporous Spongy Monolith and its Application for Concentration of Polyaromatic Hydrocarbons
T. Tanigawa, K. Kato, Y. Watabe, T. Kubo, K. Hosoya, *J. Sep. Sci.*, 34, 2193-2198, 2011

8) Determination of Bisphenol A with Effective Pretreatment Medium Using Automated Column Switching HPLC with Fluorescence Detection
T. Tanigawa, Y. Watabe, T. Kubo, K. Hosoya, *J. Sep. Sci.*, 34, 2840-2846, 2011

9) Synthesis of Novel Polymer Type Sulfoxide Solid Phase Combined with the Porogen Imprinting for Enabling Selective Separation of Polychlorinated Biphenyls
Y. Tominaga, T. Kubo, A. Kobayashi, K. Yasuda, K. Kato, K. Hosoya, *Chemosphere*, 89, 378-382, 2012

10) Development of Molecularly Imprinted Porous Polymers for Selective Adsorption of Gaseous Compounds
Y. Tominaga, T. Kubo, K. Yasuda, K. Kato, K. Hosoya, *Micro. Meso. Mater.*, 156, 161-165, 2012

11) 分子選択的前処理を目的とした分子インプリント法の応用技術開発
久保拓也, *分析化学*, 61, 371-381, 2012

12) Specific Chromatographic Retentions on Polymer Pore Surface of Macroporous Spongy Monoliths
T. Tanigawa, T. Kubo, K. Hosoya, *Chem. Lett.*, 41, 1265-1266, 2012

13) Trace Level Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in River Water with Automated Pretreatment HPLC
Y. Watabe, T. Kubo, T. Tanigawa, Y. Hayakawa, K. Otsuka, K. Hosoya, *J. Sep. Sci.*, 36, 1128-1134, 2013

14) Hybridization of Macroporous Sponge and Spherical Microporous Adsorbent for High Throughput Separation of Ionic Solutes
T. Kubo, Y. Tominaga, K .Yasuda, K. Hosoya, K. Otsuka, *Anal. Sci.*, 29, 417-421, 2013

15) Synthesis of poly(ethylene glycol)-based hydrogels and its swelling/shrinking properties responsive for molecular recognitions
Y. Tominaga, T. Kubo, K .Hosoya, K. Otsuka, *J. Polym. Sci. Part A, Polym. Chem.*, in press

(2)主な口頭発表(学会等)
***下線は発表者**
＜国際学会＞

1) Effective molecular recognition for ionic compounds by the interval immobilization technique
Takuya Kubo, Yuichi Tominaga, Ken Hosoya, MIP 2008, Kobe (Japan), September 2008

2) High throughput on-line concentration by novel separation media, named “Spongy-monolith”
Takuya Kubo, Fuminori Watanabe, Ken Hosoya, HPLC2008 Kyoto, Kyoto (Japan), December 2008

3) Selective adsorption and degradation of toxic compounds by organic-inorganic hybrid material
Takuya Kubo, Yuichi Tominaga, Ken Hosoya, The Second French Research Organizations-Tohoku University Joint Workshop on Frontier Materials, Sendai (Japan), December 2009 (Invited Speaker)

4) Development of molecularly imprinted polymers enabling selective adsorption for gaseous compounds
Y. Tominaga, T. Kubo, K. Hosoya, ICAS2011, Kyoto (Japan), May 2011

5) The basic study of spongy monoliths and its applications
T. Kubo, K. Kato, T. Tanigawa, Y. Watabe, Y. Tanaka, K. Hosoya, ICAS2011, Kyoto (Japan), May 2011 (Invite Speaker)

6) Effective separation and photodegradation of water-soluble toxic compounds by the molecularly imprinted adsorbents
T. Kubo, K. Otsuka, The 6th Shanghai International Symposium on Analytical Chemistry, Shanghai (China), October 2012 (Invited Speaker)

＜国内学会＞

1) 高速分析に適した新規カラムの開発
久保拓也，渡辺史憲，細矢憲，彼谷邦光，第 15 回クロマトグラフィーシンポジウム，静岡，2008 年 5 月

2) 分子認識材料の開発と環境分析の高効率化への応用
久保拓也，第 11 回機能構造と分析化学シンポジウム，仙台，2009 年 3 月（依頼講演）

3) ハイスループット分離・分析を目指したスポンジ様カラムの開発
久保拓也，渡辺史憲，彼谷邦光，細矢憲，第 70 回分析化学討論会，和歌山，2009 年 5 月

4) イオン性化合物に対して選択的吸着・分解を目的とした光触媒複合体の合成
冨永雄一，久保拓也，細矢憲，平成 21 年度化学系学協会東北大会，郡山（福島），2009 年 9 月

5) 選択的吸着・分解機能を有する光触媒複合体の評価
冨永雄一，久保拓也，細矢憲，日本分析化学会第 58 年会，札幌，2009 年 9 月

6) イオン性官能基の距離認識による毒性化合物の選択的捕捉と光分解への応用
冨永雄一，久保拓也，細矢憲，第 20 回クロマトグラフィー科学会議，東京，2009 年 11 月

7) スポンジモノリスの固相抽出剤への応用
久保拓也，谷川哲也，田中良知，加藤啓太，渡辺史憲，細矢憲，第 20 回クロマトグラフィー科学会議，東京，2009 年 11 月

8) 光触媒への分子認識部位の導入と水質保全への応用
冨永雄一，久保拓也，細矢憲，第 17 回クロマトグラフィーシンポジウム，広島，2010 年 6 月

9) 新着想スポンジモノリスの開発と分析前処理への応用
久保拓也，日本分析化学会第 59 年会，仙台，2010 年 9 月（依頼講演）

10) みぢかな水環境のための高分子多孔質体の開発
細矢憲，第 21 回クロマトグラフィー科学会議，西宮，2010 年 10 月（招待講演）

11) ガス状物質に対するインプリントポリマーの開発
冨永雄一，久保拓也，細矢　憲，第 21 回クロマトグラフィー科学会議，西宮，2010 年 10 月

12) PCB 類の選択的捕捉を目的とした新規スルホキシド固定相の開発
冨永雄一，小林厚，久保拓也，細矢憲，第 18 回クロマトグラフィーシンポジウム，福岡，2011 年 5 月

13) 分子インプリント法を用いた親水性化合物に対する分析前処理剤の開発
久保拓也，日本分析化学会第 60 年会，名古屋，2011 年 9 月（受賞講演）

14) 粒子含有型スポンジモノリスの開発
安田紘治，加藤啓太，冨永雄一，久保拓也，細矢憲，日本分析化学会第60年会，名古屋，2011年9月

15) 分子認識材料の開発と分離・分析への応用～生体応用を夢見て？～
久保拓也，ぶんせき秘帖～巻ノ六～，交野（大阪），2012 年 8 月（依頼講演）

16) 高通水性多孔膜－微粒子ハイブリッド材料を用いた高速分析前処理剤の開発
久保拓也，細矢憲，大塚浩二，日本分析化学会第 61 年会，金沢，2012 年 9 月

17) 分子刺激応答性ヒドロゲルを用いた水溶性化合物の選択的捕捉
冨永雄一，久保拓也，細矢憲，大塚浩二，日本分析化学会第 61 年会，金沢，2012 年 9 月

18) 分離剤設計のためのマテリアルデザインと表面化学
久保拓也，第 32 回キャピラリー電気泳動シンポジウム，池田（大阪），2012 年 11 月（依頼講演）

19) 機能性高分子多孔体の開発とクロマトグラフィー分析の簡便化
細矢憲，第 23 回クロマトグラフィー科学会議，岐阜，2012 年 11 月（受賞講演）

20) 油中 PCB の選択的分離を目的としたスルホキシド含有型分子インプリント固相剤の開発
小林厚，冨永雄一，久保拓也，細矢憲，第 23 回クロマトグラフィー科学会議，岐阜，2012 年 11 月

21) スポンジモノリスの保持特性及び機能化の検討
谷川哲也，久保拓也，細矢憲，第 23 回クロマトグラフィー科学会議，岐阜，2012 年 11 月

22) PEG 系ヒドロゲルの分子認識刺激に基づく膨潤・収縮挙動の基礎評価
冨永雄一，久保拓也，末吉健志，細矢憲，大塚浩二，第23回クロマトグラフィー科学会議，岐阜，2012年11月

7. 研究者略歴

課題代表者:細矢　憲
京都大学大学院理学研究科修了，理学博士
現在，京都府立大学大学院生命環境科学研究科　教授

研究参画者
(1):細矢　憲(同上)
(2):久保　拓也
京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科修了，博士(工学)
現在，京都大学大学院工学研究科　准教授
(3):早川　禎宏
大阪大学理学部卒業
現在，(株)島津製作所分析計測事業部グローバルアプリケーション開発センター　グループ長
(4):渡部　悦幸
京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科修了，博士(工学)
現在，(株)島津製作所分析計測事業部グローバルアプリケーション開発センター　主任
(5):井上　健二
京都大学大学院工学研究科修了，工学博士
現在，(株)カネカR&D企画部　部長

B-0806　　擬似分子鋳型を用いた環境汚染物質の選択的捕捉技術の開発

(1) 高感度分析システムの実用化に関する研究

京都府立大学　大学院生命環境科学研究科　応用生命科学専攻　細矢　憲
京都大学　大学院工学研究科　材料化学専攻　久保　拓也
（株）島津製作所　分析計測事業部グローバルアプリケーション開発センター　早川　禎宏
（株）島津製作所　分析計測事業部グローバルアプリケーション開発センター　渡部　悦幸

平成20～24年度累計予算額：58,135千円
（うち，平成24年度予算額：11,991千円）
予算額は，間接経費を含む。
平成20年度まではナノテクノロジーを活用した環境技術開発推進事業予算にて実施。

［要旨］
河川水や湖沼水などに普遍的に存在する植物由来のフミン質を除去する効果を付与した表面修飾型ポリマー充てん剤を，ポンプによる大量試料負荷が可能なカラムスイッチング高速液体クロマトグラフ（HPLC）に組み込み，フミン質除去による質量検出計での感度向上効果を河川水中のビスフェノールA（BPA），17β-エストラジオールなど，微量環境化学物質の定量分析においてその効果を確認した。さらにカラムスイッチング用の高圧バルブ以外に，前処理流路の洗浄，置換，分析カラムの洗浄等のために多バルブ化したシステムを構築し，その効果を河川水実試料の連続分析において確認した。実用性の見地から2バルブシステムを基本とし，上記環境化学物質やPPCPs（Pharmaceuticals and Personal Care Products）と呼ばれる医薬品等を質量検出計と併せて汎用性が大きく，安価な紫外-可視吸光検出器，蛍光検出器との組み合わせでも微量分析に必要な感度等諸元性能が確保されていることを確認した。さらに，本システムの適用範囲を広げるべく，疎水性の高い発がん性物質である多環芳香族炭化水素（polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH）15成分の同時一斉分析を試みた。疎水吸着による回収率低下を回避する別流路を追加することにより，PAHsの分析にも対応可能であることが確認できた。これらの基礎検討を踏まえ，実用上の利便性向上のため，バルブ切換プログラムを簡便に作成する支援ソフトを新たに作製し，周辺技術のパッケージ化を進めて前処理カラムを含め，本システムを製品化し，市販を開始した。

［キーワード］
カラムスイッチング，自動濃縮，環境化学物質，計測技術，高速液体クロマトグラフィー

１．はじめに

最近の報告では，極微量の環境化学物質が生態系に与える影響も懸念されており，特に環境水中の微量化学物質の濃度を精度よく，かつ迅速，簡便に測定することの必要性は非常に大きいと考えられる[1)]。定量下限値の目安としては，1-10 ng/L程度までの濃度が安定して測定できることで

あろうと考えられる。

現在広く使われている方法は，化学分析法と機器分析法に大別され，前者では酵素結合免疫吸着法（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA法）や放射免疫測定（Radioimmunoassay, RIA法）などが用いられている。これらは簡便ではあるが，信頼性，安定性で問題を指摘される場合もある[2)-7)]。ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）法は高い選択性と感度を有するものの，試料前処理に多大な手間と時間が必要であり，ともすれば分析のスループットに問題を生じ易い[8)-13)]。一方，HPLCを用いる方法は，簡単な前処理で分析が可能であり，検出法として吸光度，蛍光，電気化学検出，質量分析（MS）等々が利用可能である[14)15)]。しかしながら，感度的には優位な質量検出法を用いても10 ppt（parts per trillion (ng/L)）以下の濃度を定量するためには，試料の濃縮操作が必要である。そのためには，ポンプで水試料を直接注入できる形式のカラムスイッチングHPLCシステムは有効な手段である[16)17)]。本研究では，擬似分子鋳型を用いた高選択性の前処理媒体を利用できるプラットフォームとしての高感度自動濃縮システムの構築と，各種検出器との組み合わせの最適化を図った。組み合わせる検出法の中では，質量検出法は選択性が大きいものの，大気圧イオン化法を選択した場合には，共存成分の影響で目的成分のイオン化効率が変化する，いわゆるマトリックス効果という現象が知られており，この現象が原因のひとつとなって検出感度が低下する場合がある。環境水試料の質量検出で現れるこの現象の原因がフミン質であり，これを前処理濃縮段階で排除する表面修飾法については既報[16)]している。この効果をさらに詳しく調べて実証データを採取することも重要である。また，分析手法の実用性を高めるために，カラムスイッチング分析で多く見受けられる分析カラムおよび前処理カラムの詰まりによる圧力上昇という問題を回避する手法を確立する必要があり，前処理カラムの妨害除去効果の確認と併せて，本研究の大きな課題である。さらに質量検出よりも汎用性が高く，安価な吸光度検出，蛍光検出との組み合わせ，前処理流路への吸着が予想される高疎水性化合物への適応，操作性を容易にする専用ソフトウエアの開発などが，研究の対象となる課題であると考えられる。

２．研究開発目的

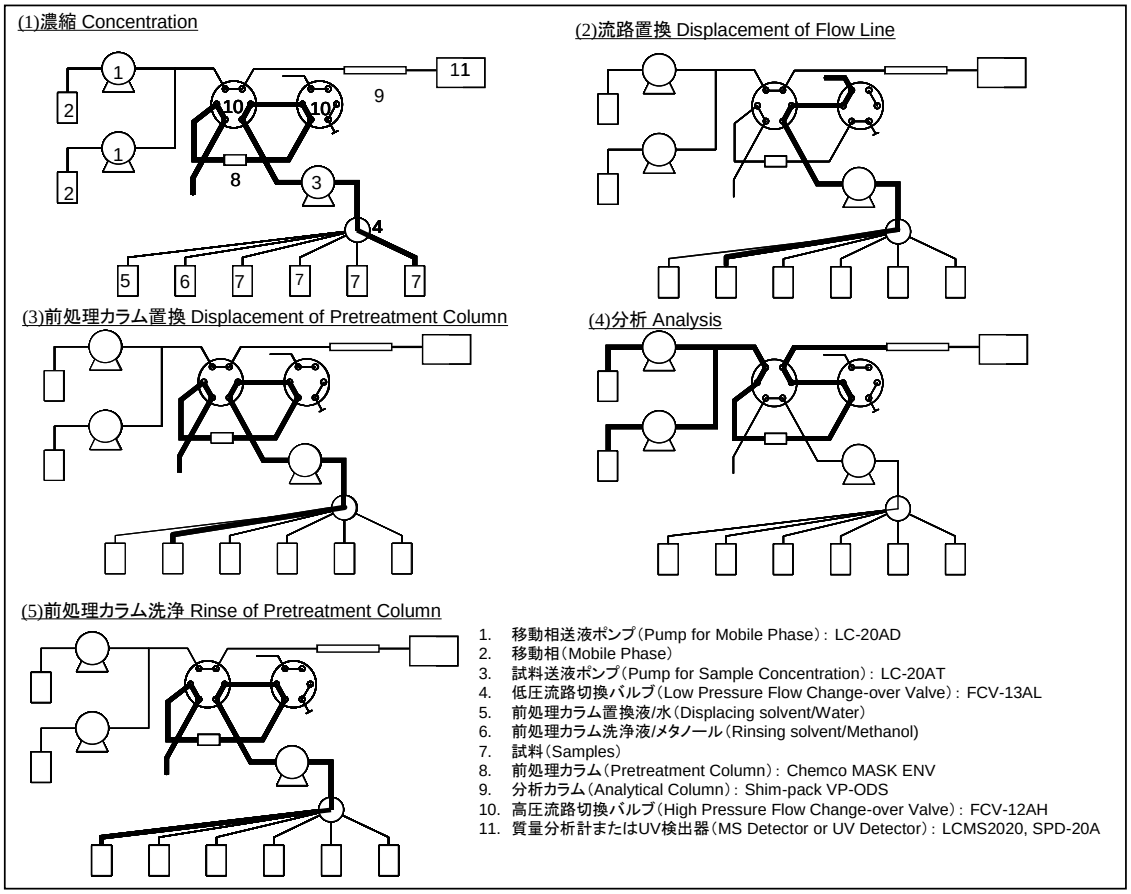
本研究の目的は以下のようにまとめられる。

・前処理，分析カラムの耐久性向上のため，前処理流路の置換，洗浄を行える流路構成を含むシステムを構築し，その効果を確認する。
・フミン質除去効果を持った表面修飾粒子の前処理カラムの効果を河川水試料中で確認し，この前処理カラムの市販を行う。
・質量検出以外の汎用性の高い検出器との組み合わせでもng/Lレベルの微量分析を実施する。
・本システムの適応範囲を広げるため，発がん性のあるPAHsを例に疎水性の大きな流路吸着の可能性のある化合物の分析方法を確立する。
・本システムを製品化し，市販を開始する。

３．研究開発方法

（１）システム構築

通常，システムに1つ組み込まれているバルブを2バルブ（置換，洗浄流路のパージを容易にしたもの）と3バルブ（2バルブの機能に加えて分析カラムの逆転洗浄を可能にしたもの）の比較を行ったが，装置制御の点から2バルブシステムを採用し，1回あたり，50 mLの河川水ポンプ注入を150回以上繰り返し，前処理カラム，分析カラムの圧力変化を確認した。併せて比較のため，前処理カラムの置換洗浄を行わない場合のカラム圧力変化についても確認実験を行った。
図(1)-1に本システムでの流路切換動作の説明を記す。



図(1)-1 カラムスイッチングシステムの流路切換順序

本システムは高圧流路切換バルブ2つ，低圧流路切換バルブ1つを組み込んだカラムスイッチングシステムである。試料は，あらかじめ0.22 μmのメンブレンフィルタでろ過したものを試料導入用ポンプに接続した。試料導入から分析への動作手順を以下に示す。

- 試料濃縮
- 流路残存試料の排除洗浄
- 前処理カラムの分析前置換
- 分析
- 分析中に前処理カラムの洗浄，再生

これらの動きに対応する流路の接続状態を示したものが図(1)-1で，それぞれ，前述の動作説明の見出し番号に対応する。

また，回収率の算出など，標準溶液注入には上記システムの分析流路に試料注入装置を接続して，分析を行った。

採用した分析条件の詳細は，以下の通り。

移動相: 10 mM リン酸(ナトリウム)/acetonitrile=65/35 (v/v)
試料溶出後にacetonitrile70%として分析カラムを洗浄した。
分析用流速: 0.8 mL/min
前処理用流速: 2.0 mL/min
試料注入量: 50 mL
前処理カラム: MASK-ENVカラム (30 mm × 4.0 mm i.d..)
分析カラム: Shim-pack VP-ODS (150 mm × 4.6 mm i.d.)
温度: 40 °C
流路置換時間: 1 min (2.0 mL)
前処理カラム置換時間： 4 min (8.0 mL)

（２）フミン質除去

吸光度検出法と組み合わせてフミン質の除去を示すデータを採取して，さらに河川水中のビスフェノールA，17β-エストラジオール（E2）を質量検出することにより，前処理カラムの表面修飾の有無によるピーク検出感度の差を確認することで評価を行った。質量検出の際の分析条件は下記の通り。

移動相: water/methanol=40/60-5/95 (v/v) グラジエント溶離（30分，直線）
分析用流速: 0.2 mL/min
前処理用流速: 2.0 mL/min
試料注入量: 50 mL
前処理カラム: MASK-ENV (10 mm × 4.0 mm)
分析カラム: Shim-pack VP-ODS (150 mm × 2.0 mm i.d.)
温度: 40 °C
流路置換時間: 1 min (2.0 mL)
前処理カラム置換時間： 4 min (8.0 mL)
イオン化: APCI (ネガティブ)
モニタリングイオン: m/z 227，233，271，274
本システムの信頼性確認のため，直線性，再現性，検出限界等を2.0-250 ng/Lの濃度の標準品を用いて確認した。さらに河川水中PPCPsの分析を質量検出にて行った。

（３）汎用検出器への応用

汎用性の高い検出器との組み合わせによる適応範囲の拡大については，蛍光検出器で，質量検

出同様に極微量のBPAの定量分析を行った（使用した分析条件は（１）項と同じ）。蛍光検出器に関しては，RF-20A（Shimadzu）を用い， 励起波長（Ex） 230 nm， 蛍光波長（Em） 310 nm，セル温度 ：30 °Cという設定で行った。以下の項目について評価を行った。

・回収率の確認

回収率は200 ng/LのBAPを添加した河川水50 mLと10 mg/L標準溶液1.0 mLの分析結果を比較して求めた。

・再現性は10 ng/LのBPAを添加した河川水の6回繰り返し分析により得られたピーク面性の相対標準偏差として求めた。

・検出限界は1 ng/Lの標準BPA溶液の応答と米国材料試験協会（ASTM）法によるノイズからS/N=3として求めた。

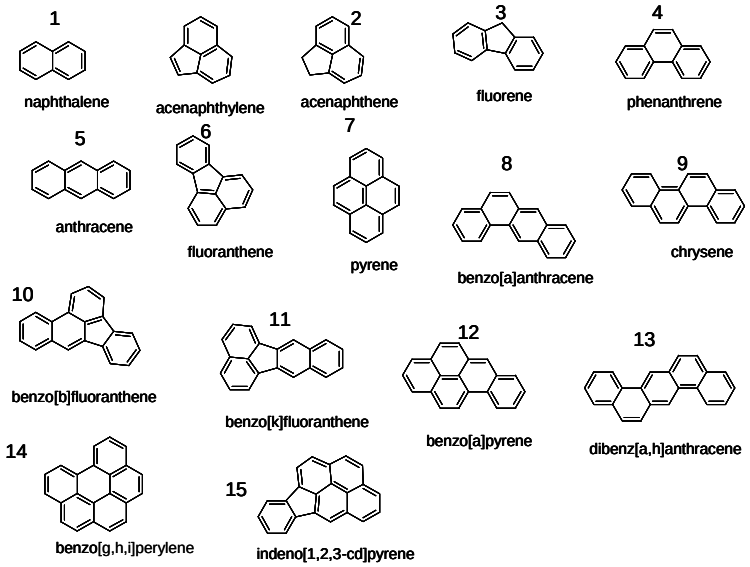
・直線性は1.0，5.0，10，100，1000 ng/Lの標準品を3回ずつ分析し，重み付けなし最小自乗法で得られた検量線の決定係数として求めた。

・実試料分析

京都市内賀茂川で採取した河川表層水に対して，5.0 ng/Lの濃度になるようにBPAを添加してカラムスイッチング濃縮分析を行った。

（４）PAHs分析への応用

以下の図(1)-2に示す米国環境保護局（EPA）指定16成分のうちacenaphthylene蛍光検出可能な15成分について，検討した。



図(1)-2　分析対象にしたEPA指定PAHs（蛍光検出可能なものについては番号を付与）

装置の構成は疎水性の大きなPAHsの接液部への吸着を抑制するために，試料の30%のacetonitrileを添加した関係上，容量，保持力の限られたMASK-ENVカラムにトラップさせるために，図(1)-3のように，吸着が予想されるポンプまでの流路以降の水で希釈する流路を設けて回収率の向上を図った。採用した移動相条件は下記。

移動相: water/acetonitrile=60/40 (v/v)

以下の条件でグラジエント溶離を実施

14 分	acetonitrile	60%
22 分	acetonitrile	100%
36 分	acetonitrile	100%

分析用流速: 1.5 mL/min

前処理用流速: 1.0 mL/min

希釈液流速: 4.0 mL/min

試料注入量: 10 mL

前処理カラム: MASK-EMV(30 mmL × 4.0 mm i.d.)

分析カラム: Restek Pinacle Ⅱ PAH (250 mmL × 4.6 mm i.d.)

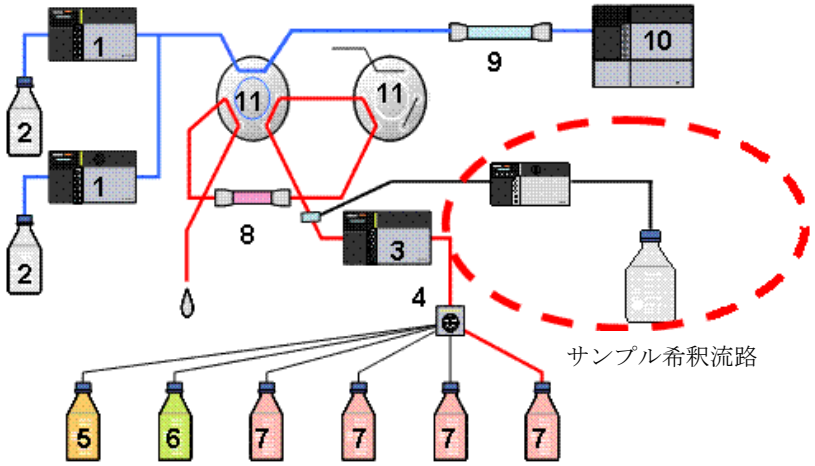
温度: 40 °C

流路置換時間: 2 min (2.0 mL)

前処理カラム置換時間： 2 min (2.0 mL)

検出 ：以下の励起/蛍光 波長の異なる 6 つの組み合わせによる波長切換

初期条件	270/330 nm (励起/蛍光)
17.5 分	250/370 nm
19.5 分	330/430 nm
21 分	270/390 nm
23 分	290/430 nm
25.5 分	370/460 nm
28 分	270/330 nm



1. 移動相用ポンプ
2. 移動相
3. サンプル用ポンプ
4. 低圧バルブ
5. リンス溶媒
6. 置換溶媒
7. サンプル
8. 前処理カラム
9. 分析カラム
10. 蛍光検出器
11. 高圧バルブ

図(1)-3　希釈流路付き自動濃縮システム

本システムによる分析法バリデーションを行うため，以下の項目を検討した。

・試料添加有機溶媒比率および，濃縮前希釈倍率の検討

吸着抑制のための添加溶媒を移動相と同じacetonitrileに固定して，Dibenz[a,h]anthracene標準品溶液（100 ng/L）に対して体積比で10-40%のacetonitrileを添加して，オートインジェクタで注入した標準溶液との比較で回収率を確認した。次に，この検討で得られたacetonitrile比率において試料希釈率は2-7倍変化させ，試料送液速度を1.0 mL/minとして，希釈液速度を変化させた。保持の大小を代表してNaphthareneとDibenz[a,h]anthraceneの回収率をオートインジェクタで注入した標準溶液との比較で確認した。

・回収率の確認

30 ng/L（但し図(1)-2の1，2は60 ng/L，3，6，10，14は300 ng/L）になるようPAHs標準品を添加した河川水試料を本システムで分析し，オートインジェクタで注入した標準溶液との比較を行い，回収率の確認を行った。

・直線性の確認

5.0，10，30，100，200 ng/L（但し図(1)- 2の1，2は各2倍，3，6，10，14は各10倍濃度）になるようPAHs標準品を添加した河川水試料で直線性の確認を行った。

・面積再現性の確認

30 ng/L（但し図(1)- 2の1，2は60 ng/L，3，6，10，14は300 ng/L）になるようPAHs標準品を添

加した河川水試料で6回繰り返し分析を行い，ピーク面積の再現性を確認した。

・検出限界，定量限界の確認

10 ng/Lになるようにして PAHs標準品を添加した河川水試料で検出限界（LOD），定量限界（LOQ）を確認した。算定は波長切換を行ったPAHsを含まない水試料のクロマトグラムの当該ピーク溶出部分のノイズレベルを測定し，その3.3倍相当の濃度をLOD，10倍相当の濃度をLOQとした。

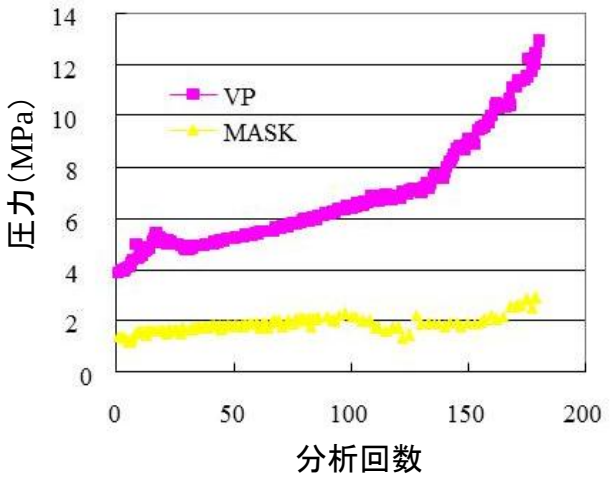
（５）システム製品化

製品化に関しては，ハードウエア関係では，システムレイアウトの決定，ソフトウエア関連は操作を簡便化するタイムプログラム作成支援ソフトを作成する，取扱説明書，カタログ等の関連資料，文書を準備する，等の作業を行った。

４．結果及び考察

（１）システム構築

実際の河川水を用いて180回の連続分析を行った。カラム圧力の推移は図(1)-4に示した。分析カラムと前処理カラムの圧力の漸増は見られるが，分析カラムでは150回の分析で圧力増加は約2.0 MPaであった。また前処理カラムの圧力増も1.0 MPa以下で，いずれも実用上は問題ない範囲であると思われる。尚，流路，前処理カラムの置換を行わない単一バルブシステムの場合，20回程度の連続注入で分析カラムの耐圧限界付近まで圧力が上昇し，使用不可能な状態になった。

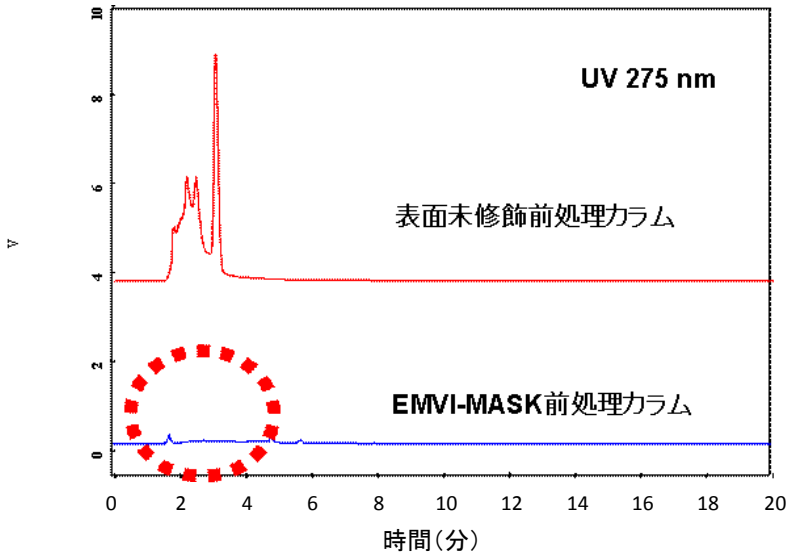


図(1)-4　河川水による連続分析時のカラム圧力変動

逆相系の分析カラムに関しては150回（7.5 L）までの実試料負荷に関しては実用性が確認できた。

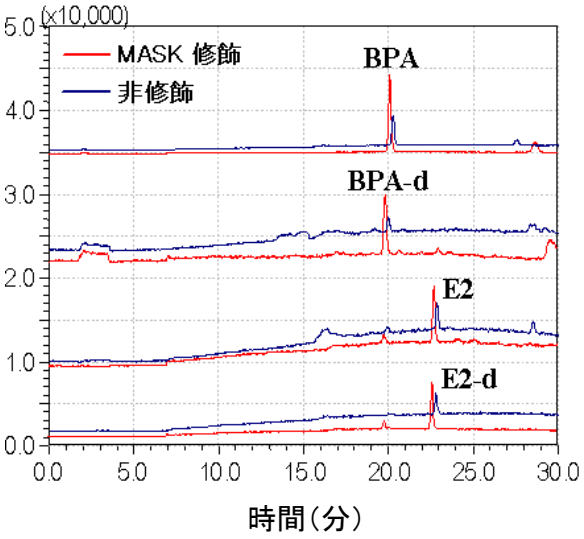
（２）フミン質除去

実際にMASKによる表面修飾効果を示したものが図(1)-5である。



図(1)-5　河川水分析における前処理用充てん剤のフミン質除去効果

吸光度検出により，フミン質除去効果が視覚化され，その効果が確認できる。さらに実際の分析での利点として，質量検出への適用を確認した。妨害成分がイオン化を阻害するイオンサプレッションはMS検出法の抱える大きな問題で，感度の不安定さが，再現性や直線性などの信頼性の向上の妨げとなっている。図(1)-6に示す選択イオン検出（SIM）モードで測定した各成分の比較クロマトグラムでは，各成分で，MASK修飾した前処理用カラムを用いた分析で得られたピークが未修飾のそれを上回る応答を示し，感度の向上に前処理カラムをMASK修飾することによる実試料中の妨害成分除去が有効であることが示された。また，感度の向上とは別に，各クロマトグラムのベースラインの変化を比較すると，MASK修飾前処理カラムで得られたクロマトグラムの方が持ち上がりの少ないきれいな状態であることがわかる。図(1)-6ではイオンサプレッションの効果はE2よりもBPAで顕著に観察できる。



図(1)-6　河川水中の10 ng/Lの修飾有無の比較SIMクロマトグラム（-dは，重水素置換体）

本カラムスイッチングシステムの回収率は以下の表(1)-1に示す。尚，回収率の計算は(ポンプ注入による500 pg相当のピーク面積)/(マニュアル注入による500 pg相当のピーク面積)として計算し，3回の繰り返し分析で再現性の相対標準偏差（RSD）も求めた。

表(1)-1　システム回収率および標準品での再現性
回収率 (%)

Run	BPA	BPA-d	E2	E2-d
1	89.3	97.5	99.5	100.7
2	89.8	92.6	100.3	100.1
3	93.9	93.0	104.2	103.5
平均	91.0	94.4	101.3	101.4
RSD(%)	2.3	2.6	2.5	1.9

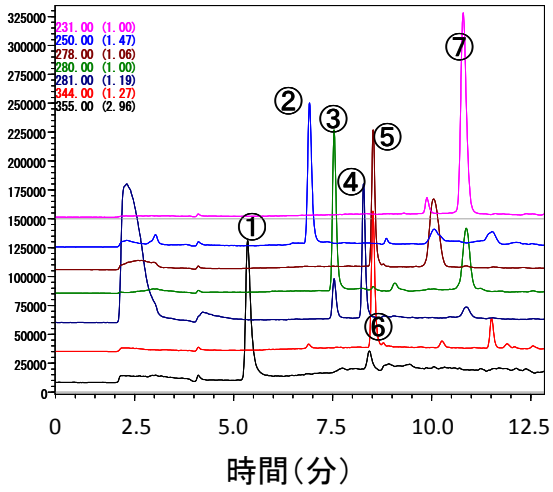
回収率は90-100%で，概ね満足できる値となった。定量の方法として重水素置換体を用いた内部標準法を採用したので，日内および日間再現性として，内部標準品との面積比の再現性を確認しその結果を以下の表(1)-2に示す。

表(1)-2　内部標準法による日間および日内再現性
各化合物あたり10 ng/Lの内部標準を含む.

	日内		日間	
Run	BPA	E2	BPA	E2
1	1.16	1.17	1.18	1.19
2	1.18	1.17	1.17	1.16
3	1.18	1.17	1.17	1.18
4	1.18	1.15	n=5 for each day	
5	1.17	1.13		
平均	1.17	1.16	1.17	1.18
RSD(%)	0.76	1.54	0.49	1.30

絶対検量線法によるばらつきと比べると内部標準法によるばらつきは小さく，また日内だけではなく，日間再現性も極めて良好であることがわかる。質量検出においては，プローブの状態などから，絶対検量線法での日間再現性は20-30%程度レスポンスがばらつくことがあるため，特に日間再現性，あるいは今回は検討できなかったが，日間再現性では内部標準法の採用は，信頼性向上への寄与が大きいと思われる。BPAとE2の内部標準法による直線性は河川水に添加した試料においても2.0-250 ng/Lの範囲で確認され，相関係数r^2はそれぞれ，0.9999以上の良好直線性を示した。さらにクロマトグラムのノイズレベルと，2.0 ng/Lのピークレスポンスから算定した検出限界（平均ノイズレベルの3.3倍とした。）は，純水添加でBPAは0.18 ng/L，E2は0.23 ng/Lであった。さらに河川水に添加した場合は，BPAのバックグラウンドが確認できたため，これを元に，添加したBPAのレスポンスの増分から算出した検出限界は0.86 ng/L，E2は0.99 ng/Lで，いずれも，共存

するマトリックスがかなり厳しい条件でも1.0 ng/L以下を検出できることがわかった。さらに医療施設からの排水などにより環境中に放出される，医薬品の7成分（1.ヨヒンビン，βブロッカー心臓病薬，2.アルプレノール，βブロッカー，心臓病，3. ドキセピン，抗うつ剤，4.イミプラミン，抗うつ剤，5. アミトリプチリン，抗うつ剤，6.ジブカシン，鎮痛麻酔，7.イソプロピルアンチピリン，鎮痛麻酔）についても，河川水添加での液体クロマトグラフ質量分析（LC/MS）での分析を行った。図(1)-7に併記したようにいずれも0.5 ng/L 以下の極めて良好な検出限界感度を得た。



①yohimbin (0.34 ng/L)
②alprenol (0.26 ng/L)
③doxepin (0.16 ng/L)
④imipramin (0.15 ng/L)
⑤amitriptyline (0.31 ng/L)
⑥dibcaine (0.49 ng/L)
⑦isopropylantipyrine (0.21 ng/L)

(detection limit in parentheses)
each10 ng/L added in river water

図(1)-7　河川水中医薬品の自動濃縮同時分析（質量検出）

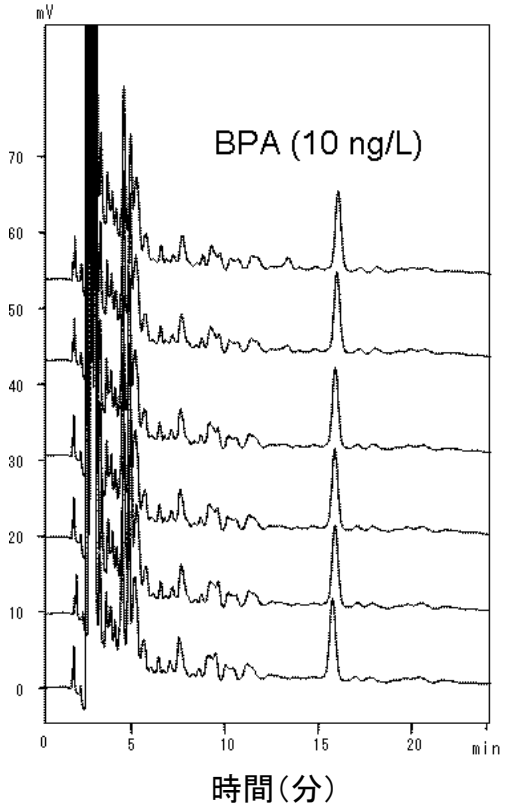
（３）汎用検出器への応用

高価な質量検出ではなく，汎用性の大きな蛍光検出器でのBPA分析に本システムを適用して得られた諸元を以下の表(1)-3に示す。

表(1)-3　蛍光検出におけるBPA分析の性能諸元

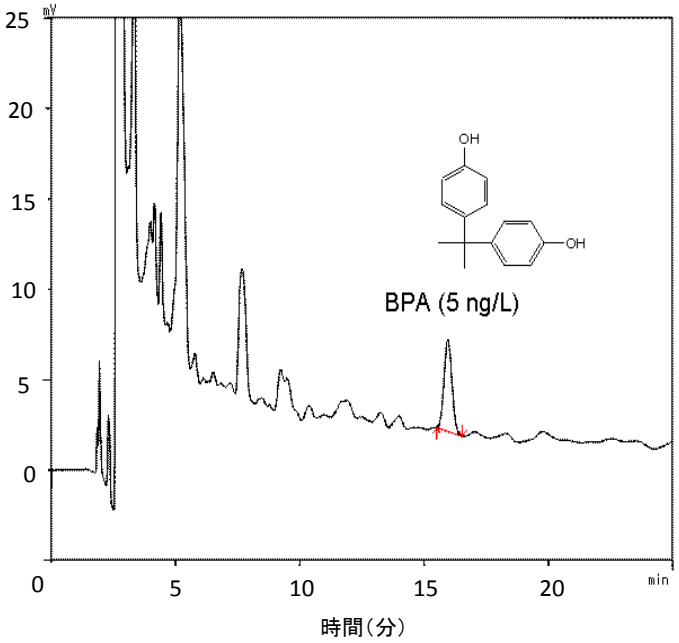
回収率	97%
再現性	1.4%RSD
検出限界	0.09 ng/L
直線性	R^2=0.9999

回収率に関しては，概ね満足できる数値となっている。再現性はn=6として計算を行った。再現性も純水に添加した試料ではなく，実試料(河川水)に標準添加した10 ng/Lとかなり低濃度の試料を用いて得られた結果であるので，これも良好な結果と判断できる。尚，再現性に関しては連続分析によって得られたクロマトグラムを図(1)-8に重ね描きクロマトグラムとして掲載する。良好な再現性が確認できた。



図(1)-8　河川水BPAの繰り返し分析（蛍光検出）

さらに微量の5.0 ng/Lを河川水に添加して蛍光検出器で分析して得られたクロマトグラムを以下の図(1)-9に示す。



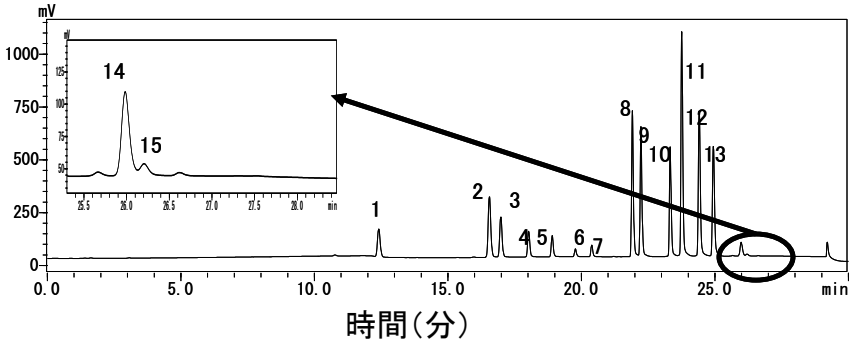
図(1)-9　BPAを5.0 ng/L添加した河川水のカラムスイッチング蛍光検出分析

検出限界に関しては，エムポアディスクでバックグラウンドのBPA濃度を抑えた標準溶液を作製した場合，0.1 ng/Lという極めて希薄な濃度であっても，検出可能であることが示された。実試料では適当な濃度の添加試料を調製できなかったため，推測になるが1.0 ng/L程度の濃度が実試料中での検出限界であろうと推察される。これが効果は質量分析計や電気化学検出器などではなく汎用性の大きな蛍光検出器で達成された検出限界であることが，大きな意味を持つ。

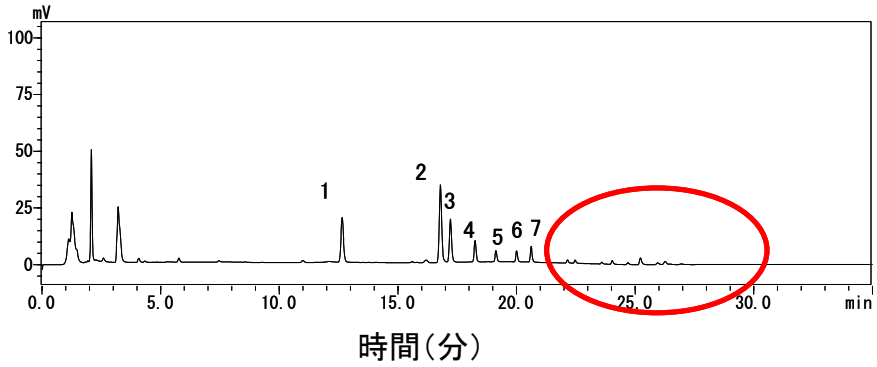
（４）PAHs分析への応用

１)通常のカラムスイッチング分析における問題点と希釈濃縮流路追加による効果

PAHs の中でも環数が多く，疎水性の大きなものは，ポンプ濃縮を行う際にサクションパイプや送液ポンプ内の樹脂部品に化学的に吸着してしまい，大幅に回収率が劣化する現象が見られる。実例として，純水に PAHs 標準品を添加してポンプ濃縮して得られたクロマトグラムと，オートインジェクタで注入した標準溶液のクロマトグラムの比較を以下に示す（図(1)-10 は標準品インジェクタ注入，図(1)-11 は標準品ポンプ濃縮注入）。



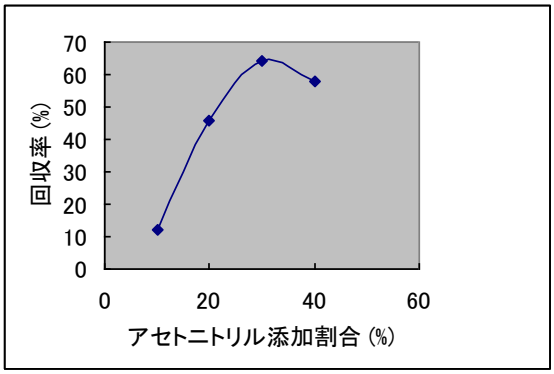
図(1)-10　オートインジェクタ注入による PAHs 標準品のクロマトグラム



図(1)-11　ポンプ濃縮による PAHs 標準品のクロマトグラム

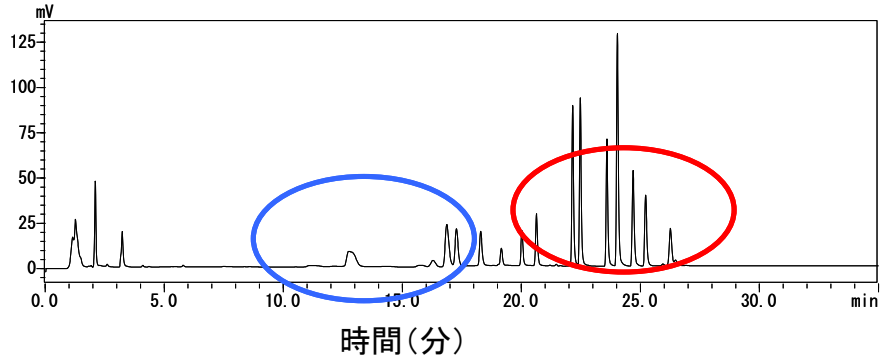
図(1)-11 の囲み部分を図(1)-10 と比較すると，ポンプ濃縮の場合は保持の強い PAHs の成分のピークは殆ど確認できない。これは疎水性の大きな PAHs が流路に吸着して回収率が大きく低下したためだと思われる。一般には移動相送液ポンプはオートインジェクタのように疎水的な成分の吸着抑制をするような特別の設計がなされていないのが普通である。従って疎水性の大きな化合物の樹脂部分への吸着による回収率の低下は充分に考えられる事象である。対策としては試料そ

のものが水であるため，これに吸着を抑制するために有機溶媒を一定量添加すれば，この回収率不良は改善されるものと思われた。そのため，疎水的な保持の大きな Dibenz[a,h]anthracene を対象成分として，100 ng/L の標準水溶液試料を作製し，同溶液に体積比で 10，20，30，40%の含有率となるように acetonitrile を添加して回収率の変化を確認した結果を図(1)-12 に示す。この結果30%添加の場合に回収率が最大になった。



図(1)-12 acetonitrile 添加濃度による Dibenz[a,h]anthoracene の回収率変化

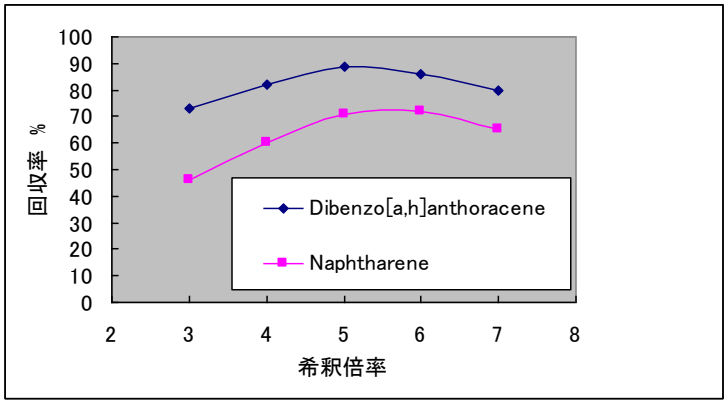
15 成分の PHAs 標準溶液に 30%（v/v）となるよう，acetonitrile を添加して，本システムによる自動濃縮分析を行って得られたクロマトグラムを以下の図(1)-13 に示す。図(1)-11 で喪失していた溶出の遅い PAHs のピークが確認できるが（右の囲み），今度は溶出の早いピークの形状劣化，あるいはピークそのもの大きさが，図(1)-11 のクロマトグラム中のピークと比較して小さくなっており，回収率の低下が見られた（左の囲み）。逆相保持モードにおいて大きな溶出力を持つ acetonitrile の効果により，保持の小さな試料が本来の保持時間よりも部分的に早く溶出する結果となった。これは濃縮カラムのサイズが小さいため，成分バンドが拡がり，濃縮段階で保持しきれずに漏出していることが原因であると考えられた。



図(1)-13　acetonitrile を 30%添加した PAHs 標準品のポンプ濃縮によるクロマトグラム

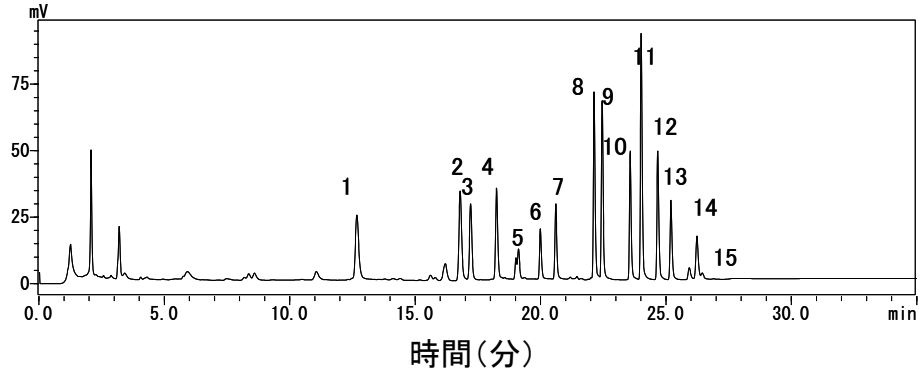
この現象の解決策として，図(1)-3 に示した試料送液ポンプの後，濃縮用の前処理カラムの前で試料溶液を純水と混合して，前処理カラム導入時の実質的な acetonitrile 濃度を低下させる流路系を付与したシステムを本分析に適用した。試料希釈によるカラムスイチング HPLC での回収率向上については，先例もある [20]が，希釈率の最適化は必要である。また，流路の構成上，なるべく

単純な流路構成が望ましいことから，当初希釈流路は図(1)-3 の 11 番左側高圧バルブ下流，前処理カラム直前での接続を試みたが，得られた結果は予想に反して回収率が悪かった。これは，希釈液も含めて，比較的大きな流速設定に対して，移動相との充分な混合に必要な容量が前処理カラム直前になく，移動相中の有機溶媒濃度に不均一性があるためだと考えられた。そのため，希釈流路接続位置は図(1)-3 のようにして，混合に使用可能な容量を前処理カラム前に確保することで所期の回収率向上が確認できた。図(1)-14 には保持の弱い PAH として Naphtharene，保持の強い PAH として Dibenz[a,h]anthracene を対象として希釈率を 3，4，5，6，7 倍と変化させた際の回収率との関係を示す。



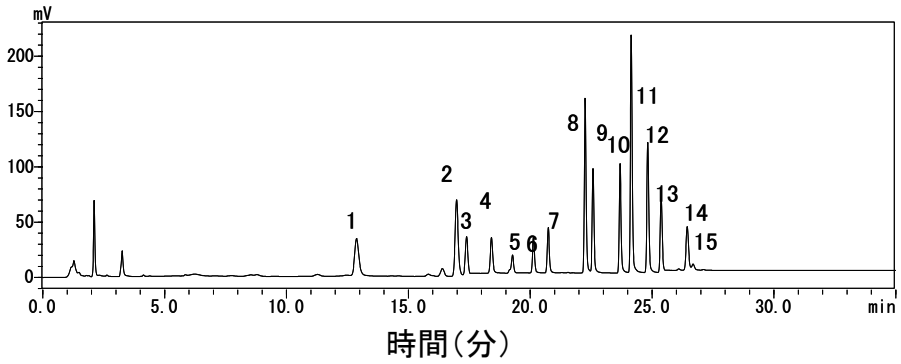
図(1)-14 希釈倍率による Dibenz[a,h]anthracene，Naphtharene の回収率変化

図(1)-13 からは 5 倍程度の希釈率で疎水性に大きな差のある PAHs の回収率の差がやや小さくなることがわかる。しかし，この検討は最初に添加有機溶媒濃度を固定して，希釈倍率を動かしており，それぞれの操作が，独立であった場合は妥当な結果が得られるが，それぞれの操作に交差反応がある場合には，条件変化のマトリックスに沿った多数回の分散分析による妥当性評価が必要になる。今回の検証範囲は前処理カラム耐圧，あるいは常識的な分析所用時間の範囲内で検討を行っている。例えば前処理流速 1.0 mL/min の状態で 20 倍希釈を行えば，前処理カラムに負荷される流速は合計 20 mL/min となり，カラム耐圧に問題が生じる。またこの対応として，流速を 1/5 とすれば，10 mL の試料量を処理するために 50 分を要することになる。そのため，実用上検討できる範囲は限られるが，その範囲内においては容認できる程度の回収率を示す条件が，30% の acetonitrile 添加と 5 倍希釈後濃縮という組み合わせであった。この条件で得られた，標準 PAHs 溶液のクロマトグラムを以下の図(1)-15 に示す。濃度は 10 ng/L（ただし 1，2 は 20 ng/L，3，6，10，14 は 100 ng/L）である。その他条件は（３）項に記載の通り。



図(1)-15　30%acetonitrile 添加，5 倍希釈後，濃縮分析により得られた PAHs のクロマトグラム

試料環境水試料に対して，有機溶媒である acetonitrile を添加することによって，試料送液系に吸着する疎水性の大きな PAHs を効率よく回収し，濃縮前に希釈流路を設けて疎水性の比較的小さな PAHs を良好なピーク形状で回収でき，それらが両立できることが図(1)-15 の結果から見てとれる。次に実際の河川水に PAHs を 30 ng/L（ただし 1，2 は 60 ng/L，3，6，10，14 は 300 ng/L）の濃度で添加して本システムで分析を行った結果，得られたクロマトグラムを以下の図(1)-16 に示す。



図(1)-16　賀茂川より採取した河川水に PAH 添加（30-300 ng/L）

河川水実試料に PAHs を添加した場合でも，ng/L レベルの濃度において良好な分離，ピーク形状が得られることを確認した。

２)本システムの性能評価結果

実験項で説明した方法によって得られた性能評価結果を以下に検討項毎に示した。

- 回収率に関しては 15 成分で 70-98%と良好であった。回収率そのものは，前項で記述したように，条件を選べば更に，良好な結果を得られる可能性はあるものの，実用的な範囲での検討結果としては概ね，信頼に足る回収率が得られたと思われる。
- 直線性は 15 成分で r^2 が 0.9991-0.9999 と良好であった。
- 再現性は，ピークの面積 RSD で 0.2-12.7%，分離に難のある最後の溶出順である Indeno[1,2,3-cd]pyrene 以外は 5%以下であった。概ね，良好といえる。

・ 検出限界は 0.1-2.8 ng/L，定量限界は 0.4-9.11 ng/L となり，殆どの成分で 1.0 ng/L 程度の検出限界と 5.0 ng/L 以下という実用上充分な定量限界が得られた。
・ 耐久性
　分析カラム，前処理カラムの河川水試料に対する耐久性については，前項記載のように，今回の 5 倍量に相当する 1 分析あたり 50 mL の河川水試料の 100 回以上の連続分析において確認されており，今回の PAHs 分析においても同様の初期の性能が発揮されているものと考えられる。

（５）システム製品化

フミン質除去のための表面修飾を行った充てん剤を用いた前処理カラムは，MASK-ENVという名前で（株）ケムコプラスより発売された。ポンプ注入による自動濃縮システムは設置レイアウト検討，分析の留意点などを収載した取扱説明書を作成し，これを島津製作所より自動濃縮システムという名称で発売した。尚，報告書の別添資料として，MASK-ENVカラムおよび自動濃縮システムのカタログを添付する。

５．本研究により得られた成果

（１）科学的意義

本研究の成果である，表面修飾型前処理カラムと，自動濃縮システムの組み合わせにより，従来，煩雑かつ所要時間の長い前処理を必要とした環境水中の極微量化学物質の分析が試料のろ過のみで自動分析が可能になった。またその適応範囲は選択性の大きな質量検出においては，フミン質除去による感度の向上という成果が，カラム耐久性の向上とともに，取得できた。さらに，質量検出よりも感度の低い汎用検出器においても，微量分析に必要な感度が得られることが確認でき，さらに濃縮流路への吸着が懸念される化合物についても，適切な吸着抑制の方法を発見した。これにより適用範囲の広い，簡便で信頼性の大きな環境水中化学物質の定量分析が可能になった。

（２）環境政策への貢献

＜行政が既に活用した成果＞

特に記載すべき事項はない。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

公定法，通知法などで，環境水試料の前処理/分析の方法としてポンプ濃縮によるカラムスイッチング分析が採用候補となる可能性がある。

６．国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

７．研究成果の発表状況

（１）誌上発表

＜論文（査読あり）＞

1) 多バルブカラムスイッチング液体クロマトグラフィー/質量分析計を用いる河川水中ビスフェノール A および 17β－エストラジオール分析における前処理の自動化
小倉泰朗，渡部悦幸，藤田登美雄，細矢憲，久保拓也，彼谷邦光，*分析化学*, 58, 293–299, 2009

2) Retention Properties of Macroporous Spongy Monolith and its Application for Concentration of Polyaromatic Hydrocarbons
T. Tanigawa, K. Kato, Y. Watabe, T. Kubo, K. Hosoya, *J. Sep. Sci.*, 34, 2193–2198, 2011

3) Determination of Bisphenol A with Effective Pretreatment Medium Using Automated Column Switching HPLC with Fluorescence Detection
T. Tanigawa, Y. Watabe, T. Kubo, K. Hosoya, *J. Sep. Sci.*, 34, 2840–2846, 2011

4) Trace Level Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in River Water with Automated Pretreatment HPLC
Y. Watabe, T. Kubo, T. Tanigawa, Y. Hayakawa, K. Otsuka, K. Hosoya, *J. Sep. Sci.*, 36, 1128–1134, 2013

＜その他誌上発表（査読なし）＞

著書

1) ベーシック機器分析化学，第0章
渡部悦幸，細矢憲，久保拓也，化学同人，2008年

解説記事

1) カラムスイッチング LCMS を用いる河川水中微量化学物質の自動前処理分析法について
渡部悦幸，私立大学環境保全学会会誌 10 号，2010 年

（２）口頭発表（学会等）

*下線は発表者

＜国際学会＞

1) Improved technique of pretreatment method for environmental water analysis using column switching LC-MS
Tairo Ogura, Yoshiyuki Watabe, Tomio Fujita, Takuya Kubo, Ken Hosoya, Kunimitsu Kaya, HPLC2008 Kyoto, Kyoto (Japan), December 2008 (Poster)

2) Analysis of trace components in environmental water by automated column-switching LC-MS system
Tairo Ogura, Yoshiyuki Watabe, Hirohisa Mikami, Tomio Fujita, Takuya Kubo, Ken Hosoya, Kunimitsu Kaya, PITTCON 2009, Chicago (USA), March 2009 (Poster)

3) Automated determination of bisphenol A, 17-β estradiol and wasted drugs in river water with multi-valve column switching LC-MS in river water with multi-valve column switching LC-MS
Yoshiyuki Watabe, Tairo Ogura, Tomio Fujita, Takuya Kubo, Ken Hosoya, Kunimitsu Kaya, HPLC2009, Dresden (Germany), June 2009 (Poster)

4) Ultra low level determination of bisphenol A in river water using column-stitching HPLC with fluorescence and mass-spectrometry detection
Y. Watabe, T. Hine, H. Mikami, T. Kubo, K. Hosoya, T. Tanigawa, International Symposium on Separation Science, Rome (Italy), September 2010 (Poster)

5) Ultra low level determination of bisphanol A in river water using column-switching HPLC with fluorescence and mass-spectrometry detection
Y. Watabe, T. Hine, T. Tanigawa, T. Kubo, K. Hosoya, ICAS2011, Kyoto (Japan), May 2011 (Poster)

6) Ultra low level determination of bisphenol A and poly aromatic hydrocarbons in river water using column-stitching HPLC with fluorescence detection
Y. Watabe, T. Hine, T. Tanigawa, T. Kubo, K. Hosoya, HPLC2011, Budapest (Hungary), June 2011 (Poster)

7) Ultra low level determination of bisphenol A, 17-β estradiol and poly aromatic hydrocarbons in river water using fully automated column-stitching HPLC
Y. Watabe, Y. Hayakawa, T. Tanigawa, T. Kubo, K. Hosoya, SETAC2012, Berlin (Germany), May 2012 (Poster)

8) Easy and high sensitivity determination of chemical pollutants in river water by using fully automated column-switching HPLC
Y. Watabe, A. Nomura, Y. Hayakawa, T. Tanigawa, T. Kubo, K. Hosoya, HPLC2012, Anaheim (USA), June 2012 (Poster)

9) Trace level determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in river water with automated pretreatment HPLC
Y. Watabe, Y. Hayakawa, T. Kubo, T. Tanigawa, K. Hosoya, ISC2012, Toruń (Poland), September 2012 (Poster)

10) Trace Level determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in river water with automated pretreatment HPLC
Y. Watabe, Y. Hayakawa, T. Kubo, T. Tanigawa, K. Hosoya, SETAC Asia Pacific 2012, Kumamoto (Japan), September 2012 (Poster)

＜国内学会＞

1) カラムスイッチング LC-MS による河川水中微量成分分析-堅牢性評価
小倉泰郎，渡部悦幸，三上博久，藤田登美雄，久保拓也，細矢憲，彼谷邦光，第 15 回クロマトグラフィーシンポジウム，静岡，2008 年 5 月（ポスター）

2) 多バルブカラムスイッチング LCMS を用いる河川水中環境化学物質および医薬品廃棄物の自動分析
渡部悦幸，小倉泰朗，三上博久，日根隆，久保拓也，細矢憲，彼谷邦光，みちのく分析科学シンポジウム 2009，仙台，2009 年 7 月（ポスター）

3) 多バルブカラムスイッチング LCMS を用いる河川水中環境化学物質および医薬品廃棄物分析における前処理の自動化
渡部悦幸，小倉泰朗，三上博久，谷川哲也，日根隆，久保拓也，細矢憲，彼谷邦光，日本分析化学会第 58 年会，札幌，2009 年 9 月（ポスター）

4) 表面修飾型前処理カラムと多バルブカラムスイッチング LCMS を用いる河川水中環境化学物質分析における前処理の自動化
渡部悦幸，小倉泰朗，三上博久，日根隆，久保拓也，細矢憲，彼谷邦光，谷川哲也，第 20 回クロマトグラフィー科学会議，東京，2009 年 11 月（ポスター）

5) 蛍光検出法を用いた河川水中微量環境化学物質の HPLC 自動濃縮分析
渡部悦幸，三上博久，日根隆，久保拓也，谷川哲也，細矢憲，日本分析化学会第 59 年会，仙台，2010 年 9 月（ポスター）

6) 蛍光検出法による河川水中ビスフェノール A および多環芳香族炭化水素の超微量カラムスイッチング HPLC 分析
渡部悦幸，日根隆，谷川哲也，久保拓也，細矢憲，日本分析化学会第 60 年会，名古屋，2011 年 9 月（ポスター）

7) カラムスイッチング HPLC を用いた河川水中の芳香族炭化水素の高感度蛍光検出分析法の開発
渡部悦幸，日根隆，谷川哲也，久保拓也，細矢憲，第 22 回クロマトグラフィー科学会議，仙台，2011 年 11 月（ポスター）（2011）

8) 河川水中微量多環芳香族炭化水素の HPLC 自動前処理分析
渡部悦幸，早川禎宏，谷川哲也，細矢憲，久保拓也，第 23 回クロマトグラフィー科学会議，岐阜，2012 年 11 月（ポスター）

9) HPLC を用いた多環芳香族炭化水素のオンライン濃縮分析
渡部悦幸，早川禎宏，谷川哲也，細矢憲，久保拓也，第20回環境ホルモン学会，東京，2012年12月（ポスター）

（３）出願特許

1) 渡部悦幸，小倉泰郎：島津製作所；「試料前処理装置及び液体クロマトグラフ装置」，登録番号 04946647　2012-03-16

（４）シンポジウム，セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

（５）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

（６）その他

特に記載すべき事項はない。

８．引用文献

1) Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening
C. Desbwow, E.J. Routledge, G.C. Brighty, J.P. Sumper, M. Waldock, *Environ. Sci. Technol*., 32, 1549–1558, 1998

2) Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry
C.H. Huang, D.L. Sedlak, *Toxicol. Chem.*, 20, 133–139, 2001

3) Combination of automatic HPLC-RIA method for determination of estrone and estradiol in serum
T. Yasui, M. Yamada, H. Kinoshita, H. Uemura, N. Yoneda, M. Irahara, T. Aono, S. Sunahara, Y. Mito, F. Kurimoto, K. Hara, *J. Clin. Lab. Anal.*, 13, 266–272, 1999

4) 浜田，田口，後藤，藤田，中村，日本分析化学会第47年会講演要旨集 p.164, 1998

5) Estrone and estradiol-17β concentration in tissue of the scleractinian coral, Montipora verrucosa
A.M. Tarrant, S. Atkinson, M.J. Atkinson, *Comp. Biochem. Physiol. A*, 122, 85–92, 1999

6) Biological measurement of estrogenic activity in urine and bile conjugates with the in vitro ER-CALUX reporter gene assay
J. Legler, A. Jonas, A. Brouwer, A.J. Murk, *Environ. Toxicol. Chem.*, 21, 473–479, 2002

7) The fate and behaviour of human estrogens in a night soil treatment process
H. Takigami, N. Taniguchi, T. Matsuda, M. Yamada, Y. Shimizu, S. Matsui, *Water Sci. Technol.*, 42, 45–51, 2000

8) Determination of Endocrine-Disrupting Phenolic Compounds and Estrogens in Surface and Drinking Water by HRGC−(NCI)−MS in the Picogram per Liter Range
H. Kuch, K. Ballschmiter, *Environ. Sci. Technol.*, 35, 3201–3206, 2001

9) Quantitative analysis of estrogens in human urine using gas chromatography/negative chemical ionisation mass spectrometry
X. Xiao, D. McCally, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14, 1991–2001, 2000

10) Trace analysis of estrogenic chemicals in sewage effluent using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry
A. Lagana, A. Bacoloni, G. Fago, A. Marino, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14, 401–407, 2000

11) Assessment of estradiol and its metabolites in meat
D. Manue, Y. Deceuninck, K. Pouponneau, A. Paris, B. Le Bizec, F. Andre, *Microbiol. Immunol. Scand.*, 109, 365–372, 2001

12) Determination of estrone and 17β-estradiol in human hair by gas chromatography–mass spectrometry
M.H. Choi, K.R. Kim, B.C. Chung, *Analyst*, 125, 711–714, 2000

13) Analysis of steroids in environmental water samples using solid-phase extraction and ion-trap gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–tandem mass spectrometry
C. Kelly, *J. Chromatogr. A*, 872, 309–314, 2000

14) Sensitive method for the determination of bisphenol-A in serum using two systems of high-performance liquid chromatography
J. Sajiki, K. Takahashi, J. Yonekubo, *J. Chromatogr. B*, 736, 255–261, 1999

15) Determination of bisphenol A in blood using high-performance liquid chromatography-electrochemical detection with solid-phase extraction
J. Sajiki, *J. Chromatogr. B*, 775, 9–15, 2001

16) Improved Detectability with a Polymer-based Trapping Device in Rapid HPLC Analysis for Ultra-low Levels of Bisphenol A (BPA) in Environmental Samples
Y. Watabe, T. Kondo, H. Imai, M. Morita, N. Tanaka, J. Haginaka, K. Hosoya, *Anal. Sci.*, 20, 133–137, 2004

17) Fully automated liquid chromatography-mass spectrometry determination of 17beta-estradiol in river water.
Y. Watabe, T. Kubo, T. Nishikawa, T. Fujita, K. Kaya, K. Hosoya, *J. Chromatogr. A*, 1120, 252–259, 2006

18) Monodisperse polymer beads as packing material for high-performance liquid chromatography. Synthesis and properties of monidisperse polystyrene and poly(methacrylate) latex seeds
V. Smigol, F. Svec, K. Hosoya, Q. Wang, J.M.J. Frechet, *Angew. Macromol. Chem.*, 195, 151–164, 1992

19) Influence of the seed polymer on the chromatographic properties of size monodisperse polymeric separation media prepared by a multi-step swelling and polymerization method
K. Hosoya, J.M.J. Frechet, *J. Polym. Sci. Part A, Polym. Chem.*, 31, 2129–2141, 1993

20) Reducing Bisphenol A Contamination from Analytical Procedures To Determine Ultralow Levels in Environmental Samples Using Automated HPLC Microanalysis
Y. Watabe, T. Kondo, H. Imai, M. Morita, N. Tanaka, K. Hosoya, *Anal. Chem.*, 76, 105–109, 2004

21) Novel surface modified molecularly imprinted polymer focused on the removal of interference in environmental water samples for chromatographic determination
Y. Watabe, K. Hosoya, N. Tanaka, T. Kubo, T. Kondo, M. Morita, *J. Chromatogr. A*, 1073, 363–370, 2005

22) LC/MS determination of bisphenol A in river water using a surface-modified molecularly-imprinted polymer as an on-line pretreatment device
Y. Watabe, K. Hosoya, N. Tanaka, T. Kondo, M. Morita, T. Kubo, *Anal. Bioanal. Chem.*, 381, 1193–1198, 2005

(2) 高選択性分離膜の開発と実用化に関する研究

京都府立大学　大学院生命環境科学研究科　応用生命科学専攻　細矢　憲
京都大学　大学院工学研究科　材料化学専攻　久保　拓也
（株）カネカ　R&D企画部　井上　健二

平成20～24年度累計予算額：20,545千円
（うち，平成24年度予算額：2,409千円）
予算額は，間接経費を含む。
平成20年度まではナノテクノロジーを活用した環境技術開発推進事業予算にて実施。

［要旨］
最初に，分子インプリント法に基づき，溶媒インプリント法を用いることで，揮発性有機化合物を選択的に吸着する架橋ポリマーを基材にした分子認識材料の開発に成功した。
次に，環境分析および生体試料分析における新規分離剤として，エチレン-酢酸ビニル共重合体（EVA）から調製されるスポンジモノリスを適用し，分離剤のクロマトグラフィー特性の解明と化学修飾による選択性付与の検討を行った。
さらに，ポリ塩素化ビフェニル（polychlorinated biphenyl：PCB）やダイオキシン類などの，塩素を含む芳香族化合物の分析前処理として，日本の多くの公定法に採用されている，ジメチルスルホキシド（DMSO）分配による抽出精製方法（以下，DMSO処理）に代わる前処理を可能にする固相カラムを開発した。
次に，高親水性物質，特に残留医薬品を含むPPCPs関連物質の効率的な分析を目的として，官能基間距離固定化法を用いて分子鋳型を合成し，評価した。その結果，選択的分子認識能に基づく効果的な濃縮が達成され，実河川試料中の抗うつ剤の高感度分析を実現した。
また，光触媒の酸化チタンに同手法を適用することで，天然毒物の選択的吸着・分解を可能とする光触媒ハイブリッド材料の開発に成功した。
次に，分子鋳型と多孔性膜とのハイブリッド化技術について，機能性ポリマー粒子（イオン交換樹脂）とスポンジモノリスのハイブリッド化技術を確立させるとともに，ハイブリッド化後の粒子の機能性を検証し，高流速化における吸着性能を実証した。
最後に，ヒドロゲルを利用した分子認識技術の可能性を見出し，擬似分子鋳型を用いる分子インプリント法をヒドロゲルに適用することで，特定のタンパク質を選択的に吸着し，特異的に体積変化する機能性材料の開発にも成功した。

［キーワード］擬似分子鋳型，官能基間距離固定，ポリ塩素化ビフェニル，医薬品およびパーソナルケア製品，スポンジモノリス

１．はじめに

（１）難捕捉有機分子に対する疑似分子鋳型についての検討

１）揮発性有機化合物の選択的吸着に関する研究

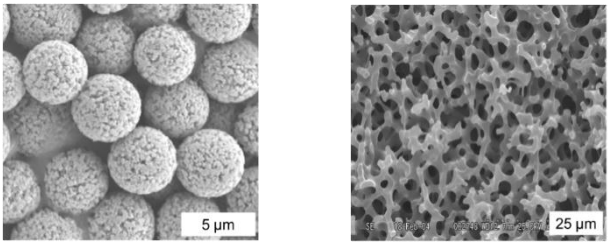
これまでガス状物質に対する選択的捕捉については，検証が成されていなかった。現在，自動車の排気ガス，工場からの排煙など，大気汚染も深刻となっており，人体に重大な悪影響を及ぼす恐れがある。そこで，大気中から選択的に特定の汚染物質を除去する技術が求められている。

２）スポンジモノリスの調製と保持特性

環境問題への関心の高まりと共に，河川や湖沼，海洋での有機物質による汚染が問題視されている。これらの汚染有機物質は極めて微量で生態系に影響を与えることが懸念されており，汚染状況を頻度高くモニタリングすることは，リスク管理の面からも非常に重要性が高い。環境水中の汚染有機物質の例として，BPAやE2，PAHs等，非常に多くの物質が問題となっている。さらに近年では河川に流出した医薬品が下水処理場の活性汚泥法で除去されずに河川に流出し，新たな環境問題を引き起こす要因となっている[1)]。

この様な多種多様な環境水中の汚染物質をモニタリングするためには，信頼性の高い高速，高感度な分析手法の開発が必要であり，定量下限値の目安として10 ng/L（ppt）程度の微量濃度が安定して測定できる分析システムが必要となる。現在までに環境水中の微量汚染物質を定量する方法として，主にHPLCが用いられている。近年，HPLCは質量分析計と組み合わせ，測定感度や測定対象物選択性が大きく向上した。しかし，グローバルな意味での環境モニタリングを行うという観点から，汎用装置の利用は大きな意味を持っている。環境水中の有機汚染物質濃度は極めて低く，試料には多くの夾雑成分が含まれるため，汎用装置でのモニタリングを可能にするには，前処理による選択的な濃縮も必要である。一方で前処理操作は環境分析で求められる分析コストや実験者の人的負担を増加させる要因となりやすく，大量の試料の連続処理が可能で，かつ高速処理可能な高選択性分離剤の開発は上記の分析コストの削減や多検体処理の問題を解決し，環境科学の発展に貢献しうる研究課題である。

現在までに前処理法として固相抽出（Solid Phase Extraction, SPE）法が広く用いられ，盛んに研究されている[2)]。SPE法に用いられる分離剤は，粒子充てん型とモノリス型に大別される。粒子充てん剤（図(2)-1a）はもっとも広く用いられる分離剤であり，数nmのメソポアを有し，比表面積が大きい特徴を持つ。この粒子を充てんしたカラムにおいて，より高性能の分離を行うためには，分離剤粒子径を小さくする必要がある。しかし粒子径の減少は通液に伴うカラム圧力の上昇をもたらすため[3)]，分離性能の向上には限界があり，前処理用分離剤としては粒子径50-200 μm程度の粒子が用いられている。また均一サイズの粒子径を持つ粒子充てんカラムは，高い分離性能を持つが，均一な粒子を得るために一般に長時間の分級操作が必要であり，分離剤コストの上昇要因となっている。さらに粒子充てん型カラムはカラムへの充てん操作が煩雑であり，合成，充てん操作自体のコストや，経験的充てんノウハウ開発にかかる研究費用は

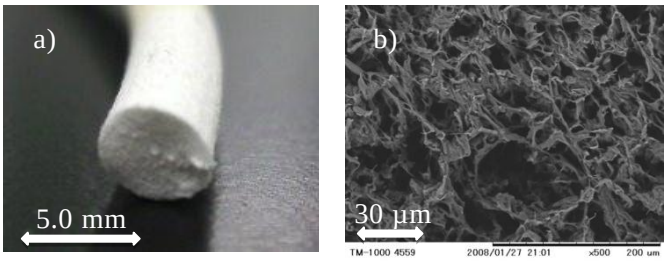


図(2)-1　既存分離剤のSEM写真

全て前処理剤のコストに反映される。環境分析に必要なスケールアップについても，大きな外とうと大量の粒子を用いることで理論上可能であるが，大量合成・分級操作の煩雑さや，スケールアップによる負荷圧上昇の問題等から，粒子充てん型分離剤のスケールアップは実用的ではない。

次に3次元の立体網目構造を持つモノリス型メディア（図(2)-1b）は，近年多くの研究者により報告され[4)-6)]，粒子充てん型カラムで実現困難な高い分離効率と高速送液を両立させた分離剤として注目されている。モノリス型分離剤は数μmサイズの貫通孔を持ち，粒子空隙を流路とする粒子充てん剤と比較して通液性が良い分離剤である。分離基材としてシリカモノリスやポリマーモノリスが利用できるが，特にシリカモノリスカラムは細い骨格に基づく高理論段数を利用して，迅速分析や生体試料の二次元クロマトグラフィーにも用いられている。しかしながら，モノリス型分離剤は孔径が10 μmを超える大きな貫通孔を合成することが困難であり，通液性の向上については限界がある[7)]。またモノリス型分離剤は相分離現象を利用して合成されるが，その重合速度や相分離速度は精密に制御する必要があり，合成のスケールアップの際に均一な構造を得ることは困難である。さらにモノリス型分離剤では，反応後に基材全体が収縮するため，合成後の成形性が低く，外とうへの充てんも困難である。

これら上述の問題を克服すべく，Kuboらが報告したスポンジモノリスは高い通水性を持ち，環境試料の分離・分析分野における新規高機能分離媒体として製品化が期待されている[8)]。スポンジモノリスは汎用の熱可塑性ポリマーであるエチレン-酢酸ビニル共重合体（EVA）の多孔体であり，孔径が数十μm程度の大きな連通孔を持つため，高流速・低負荷圧で通液可能な媒体である（図(2)-2）。



(a): 外観写真 (4.7 mm i.d.),
(b): SEM写真 (× 500)
図(2)-2 エチレン-酢酸ビニル共重合体スポンジモノリスの外観とSEM写真

また，スポンジモノリスは安価であり，合成の再現性にも優れている。さらに柔軟性なスポンジモノリスはカラムやカートリッジなどの外とうへの充てんも他の分離剤よりも容易である。このスポンジモノリスが環境用途の分離剤として実用できれば，環境科学分野及び生体分野における前処理や精製の諸問題の多くが解決可能であると考えられる。例えば，分離剤を環境モニタリングが必要な現場に持参し，オンサイトで目的物質を分離剤に吸着させた状態で試験機関に輸送すれば，実験者は大量の環境水試料の輸送業務から開放される。また高度な分析機器を持たない発展途上国の現場試料を我が国へ輸送し，高感度分析を行うなど，新たな分析ビジネスモデルの創出も期待できる。しかしEVA スポンジモノリスは，今までに分離媒体として用いられたことのない材料であり，分離基材のクロマトグラフィー特性については解明されていない。このような新規分離剤は環境分析に適した有用な分離選択性を保有しているものと期待され，そのクロマトグラフィー特性を評価することは重要である。そこで本研究では高速・高選択性と低コスト・低環境負荷を実現する新規多孔性高分子を開発し，広く普及しているクロマトグラフィー的手法を高性能化することを目標として，分離剤のクロマトグラフィー特性の解明と化学修飾による選択性付与の検討を行った。さらにスポンジモノリスを分離剤として環境試料や生体試料の分離に適用し，実試料への有用性の評価を行った。

３）PCBの選択的分離を目的としたスルホキシド含有型分子インプリント固相剤の開発
～油中PCBの捕捉について～

環境中に存在する有機化合物の分析方法において，目的成分の分析は，各種媒体の共存物質が妨害となる場合が多く，選択的な抽出や精製に多くの時間と労力を費やしているのが現状である。特にPCBやダイオキシン類などのハロゲン元素の一つである塩素を含む芳香族系の有機化合物の分析方法において，前処理方法として，油分の多い試料からの分離精製には，DMSO処理が日本の多くの公定法に採用されている（表(2)-1）。

DMSO処理は，一般的に低極性の脂肪族炭化水素の除去を目的に使用することが多い。他の前処理操作とは異なり，単独での分画効果はないため確実な前処理のためには，他の精製方法との組み合わせが必要となっているのが現状である。

表(2)-1　日本におけるPCB分析の公定法

	水質	JIS K0093（水質）	土壌	底質	廃棄物（廃油）
制定日	昭和46年（環境水） 昭和49年（排水） 平成9年（地下水）	1974年 （平成18年改訂）	平成3年	昭和61年 （平成13年改訂）	平成10年 （平成12年）
事前調製	なし	ろ過	粉砕・風乾・溶出	風乾・アルカリ分解	なし
抽出	ヘキサン抽出（液液）	ヘキサン抽出（液液・固相）	ヘキサン抽出（液液）	ヘキサン抽出（液液）	DMSO分配抽出，ヘキサン抽出
精製	アルカリ分解，シリカゲル処理	アルカリ分解，シリカゲル処理，ケイ酸マグネシウム処理	アルカリ分解，シリカゲル処理	硫酸処理，シリカゲル処理	硫酸処理，アルカリ分解，シリカゲル処理，多層シリカゲル処理
機器分析	LRGC(ECD)	GC(ECD) GCLRMS	LRGC(ECD)	GC(ECD) GCMS	GC/HRMS

このDMSO処理を固相カラムによる前処理で対応可能となると，分析における前処理の効率化につながり単位時間あたりの処理検体数の増加につながる。これは，環境モニタリングのような短期間の大規模調査等に大きく役立つと考えられる。また，近年増加している新規化学物質においても類似な構造を持つ有機化合物が多く存在し，適用範囲は広がると考えられる。

（２）難捕捉高親水性物質に対する疑似分子鋳型についての検討
１）高親水性化合物のためのトラップ層開発の検討

近年，PPCPsの環境中への流出が問題になっている。PPCPsの中には下水処理場で処理されない物質も存在し，環境中にそのまま排出される。PPCPsは生理活性を持つ物が多く，環境中では低濃度ながら生態系への影響が懸念されている。また，水系環境中の動物を介した薬剤耐性菌の発生

も懸念されている。そのような背景より，PPCPsの挙動に関する知見が早急に求められているが，PPCPsは様々な夾雑物を含む環境水中で低濃度で存在しており，そのような物質の分析は通常多くの手順や時間を必要とし，困難とされている。そのため，これらのPPCPsのための選択的な分離・濃縮を可能とする分離剤の開発が求められている。

２）官能基間距離認識による高親水性化合物の選択的分離に関する研究

近年，揮発性有機化合物，ダイオキシン類[9]などに代表される人工化学物質，あるいはミクロシスチン，サキシトキシンなどの生物由来の天然毒物[10)11)]が環境汚染物質として問題となっている。これらの環境汚染物質は極微量でも生体に影響を及ぼすため，環境保護やリスク管理の点から，高感度な定量分析や効率的な除去に寄与する分離・分析技術の開発が急務である。そこで，上述のような物理的・化学的性質の異なる環境汚染物質を選択的に吸着・分離する分離材料の開発が求められている。また，同様の分離材料は，精製が困難な抗体医薬品の単離，生体試料中の特定成分の定量等にも応用可能で，バイオ分野への展開も期待できる。

一方，特定の分子を選択的に吸着する方法として，分子インプリント法を用いる分子鋳型が注目されている。分子インプリント法は文字通り特定の分子や官能基の配置を架橋ポリマーに転写し，人工レセプター様の分子認識能を獲得する手法である[12)13)]。同法では，比較的簡単な操作で選択的な分子認識能を得ることができるため，固相抽出担体，センサー材料など種々の応用研究が報告されている。しかしながら，一般的な分子インプリント法にはいくつかの問題点があるため，毒性物質や希少な物質，特異的な官能基を持たない物質，高親水性化合物や構造柔軟性化合物など多くの環境汚染物質に従来の分子インプリント法を適用できない。そこで，これらの問題点を克服する応用技術が求められている。

３）残留医薬品の分析前処理を目的とした分子鋳型の開発

河川，湖沼等の水環境試料中の残留医薬品やその代謝物（PPCPsを含む）による環境汚染が近年問題となっており，リスクマネージメントの観点から，PPCP関連物質の環境モニタリングが求められている[14)-19)]。一方，これらの医薬品類は，一般的に親水性が非常に高いため，通常の疎水性を利用する分析前処理では濃縮が困難であり，低濃度の残留医薬品を定量的に検出することとは容易ではない。そこで，分析前処理段階における効率的な濃縮に寄与する新規分離媒体の開発が必要とされている。

４）光触媒ハイブリッド分子認識材料による高親水性化合物の選択的吸着・分解に関する研究

一般的な分子インプリント法にはいくつかの問題点があり，その問題点を克服する応用技術が求められている。その解決法の1つとして，光触媒の酸化チタンに分子インプリント法を適用することで，天然毒物の選択的吸着・分解を可能とする光触媒ハイブリッド材料の開発が求められている。

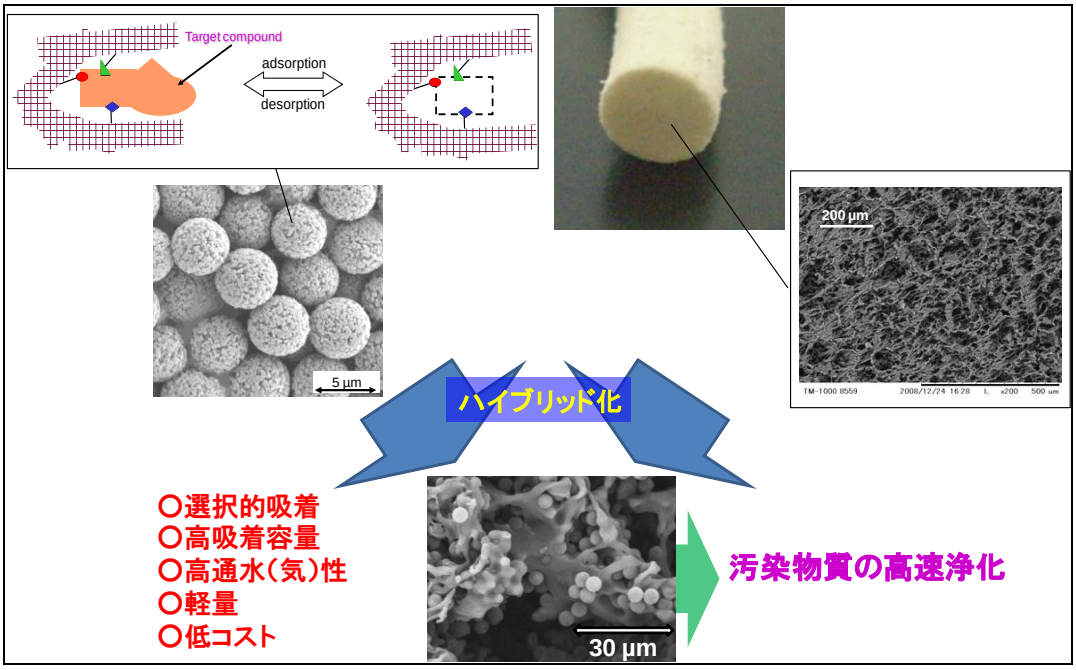
５）多孔性膜と分子鋳型のハイブリッド化技術に関する検討

環境汚染物質の効率的な除去技術開発は，現在の環境汚染問題を解決する上で必要不可欠である。特に，汚染源からの直接的な汚染物質の除去が達成されれば，現在の問題が大きく改善され

る[20)-23)]。一方で，既存技術では上記を達成できる手法はなく，主として活性炭を用いた網羅的な除去技術が主とされる。しかし，活性炭処理では，吸着に対する選択性がないため，吸着剤自身の吸着飽和がおこり，コスト面から見ても効率的ではない。そこで，本研究では，通水性に優れる連通多孔体[24)-26)]と分子認識能を有する擬似分子鋳型（ポリマー粒子）のハイブリッド化を行うことで，実用性のある新規環境浄化膜の開発を目的とする。このようなハイブリッド体を用いる研究は他に例が無く，極めて独自性の高い研究であると言える。

先の結果では，シリコーン発泡体，擬似分子鋳型粒子のハイブリッド体合成において，粒子含有率25%程度までのハイブリッド体合成に成功したが，シリコーン基材の耐溶媒性の問題や，性能の低さから，実用性が見いだせないことがわかった。このため，EVA基材の連通多孔体に対して，新たな手法によるハイブリッド化を行い，その評価を行った結果，連通多孔体の細孔表面に粒子が効率的に化学結合する手法が見いだされ，さらに，その機能はこれまでのハイブリッド体に比べて飛躍的に高いことが明らかとなった。さらに基材となる多孔体の種類，同時に，その重合方法を変化させ，ハイブリッド化させる粒子の存在状態とその粒子の機能性の変化について検討した。ハイブリット体の基礎的検討として，種々のハイブリッド体を作製し，BPAバッチ吸着実験を行い評価した。

また，続けて分子選択的な吸着・分離能を有する分子鋳型と高通水（気）性を有する多孔性膜とのハイブリッド化技術を確立し，環境汚染物質の効率的な除去技術に寄与する新規高選択性分離膜の開発を目指した。上記の結果から，ポリメタクリレート系のポリマー粒子，EVAを基材とする多孔性膜のハイブリッド化が有効であることが示された。そこで，ハイブリッド化の原理を検証すると共に，機能性粒子とのハイブリッド化，その機能評価について検討した。図(2)-3に，本研究の概念図を示した。



図(2)-3　多孔性膜と分子鋳型のハイブリッド化のイメージ図

６）距離認識を利用した伸縮性ヒドロゲルの開発とタンパク質の選択的吸着に関する研究

近年，特定の分子を選択的に吸着する人工的な分子認識材料の開発法である分子インプリント法をタンパク質などの生体高分子やウイルス，組織といった生体試料への応用が試みられている。同法で合成した分子インプリントポリマーは，抗体固定化材料などに比べて安価で化学的安定性が高く，簡便かつ短時間で合成できるため，分離剤，透析膜，バイオセンサーやアフィニティークロマトグラフィーなどへの応用が期待されている。しかしながら，タンパク質をターゲット分子とする場合，以下のような問題点が挙げられる。1点目に，分子インプリント法では非水系の架橋剤，機能性モノマーを用いることが一般的であるが，タンパク質は折りたたみ構造のために変性しやすく，重合の際に安定な天然状態を保つことが困難であることが挙げられる。2点目に，タンパク質表面に電荷を持つ官能基が多く存在し，非特異的な相互作用を低減する必要があることが挙げられる。3点目に 巨大分子のため，架橋反応の後に鋳型分子を除去することが困難であることが挙げられる。そこで，これらの問題点を克服する新技術の開発が求められている。

２．研究開発目的

（１）難捕捉有機分子に対する疑似分子鋳型についての検討

１）揮発性有機化合物の選択的吸着に関する研究

本研究において，はじめに，溶媒インプリント法を用いて気体試料である揮発性有機化合物（VOC）に対して選択的吸着能を示す架橋ポリマー基材の分子認識材料を合成し，手法の有効性および機能性モノマーを加えることによる選択性の向上に関して検討した。

２）スポンジモノリスの調製と保持特性

高通液性と低コストを実現する分離剤として，EVAから調製されるスポンジモノリスを分離剤として適用し，そのクロマトグラフィー保持特性を評価した。得られた結果より，スポンジモノリスに適した分離対象物質の選出とその環境並びに生体分野における応用について検討した。

さらに，高い通液性を確保すると同時にターゲット分子に対する選択的濃縮機能を発現させることを目的として，スポンジモノリス表面へのイオン交換基の導入方法を検討した。この化学修飾スポンジモノリスが高流速で使用した場合でも，安定した保持能を示し，高選択性ハイスループット分離剤として使用可能かを評価した。スポンジモノリスの新規分離剤としての保持特性を解明した後，製品化を目的とした応用についても検討した。

３）PCBの選択的分離を目的としたスルホキシド含有型分子インプリント固相剤の開発
～油中PCBの捕捉について～

DMSO分配による前処理は，非常に操作が複雑であり，回収率が低いため，繰り返し操作を行わなければならないことや操作に熟練を要することが知られている。

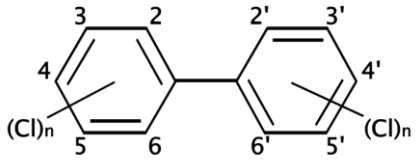
沼田らは，DMSOに含まれるスルホキシドをシリカゲル基材に付加した新しい固相剤を開発し，DMSO分配処理を固相抽出の操作によりできるという手法を発表しており，この成果をもとにした固相剤も市販されている。

本研究は，このスルホキシドをシリカゲル以外のポリマー基材に付加させた新たな固相抽出剤

の設計を試み，PCBの分離を得られる固相剤を設計・合成し，DMSO分配処理の代替方法として適用可能か検討を行った。

合成した固相剤について，コプラナーPCB（ダイオキシン様PCB）を含む31種類のPCB異性体についての検討を行った。特に，図(2)-4に示すnon-ortho-PCB（2,6位に塩素が付加していないPCB）について考察した。

non-*ortho*
#81　3,4,4’,5 -Tetrachlorobiphenyl
#77　3,3’,4,4’-Tetrachlorobiphenyl
#126　3,3’,4,4’,5-Pentachlorobiphenyl
#169　3,3’,4,4’,5,5’-Hexachlorobiphenyl
mono-*ortho*
#123　2’,3,4,4’,5-Pentachlorobiphenyl
#118　2,3’,4,4’,5-Pentachlorobiphenyl
#105　2,3,3’,4,4’-Pentachlorobiphenyl
#114　2,3,4,4’,5 -Pentachlorobiphenyl
#167　2,3,3’,4,4’,5 -Hexachlorobiphenyl
#156　2,3,3’,4,4’,5’-Hexachlorobiphenyl
#157　2,3,3’,4,4’,5,5’-Hexachlorobiphenyl
#189　2,3,3’,4,4’,5,5’-Heptachlorobiphenyl



図(2)-4　ポリ塩素化ビフェニルの構造

（２）難捕捉高親水性物質に対する疑似分子鋳型についての検討

１）高親水性化合物のためのトラップ層開発の検討

本研究では，親水性化合物の分析の前処理としての，目的の物質の効率的な捕捉・濃縮を可能にする，新しい分離媒体の開発を親水性表面修飾を用いて検討した。

２）官能基間距離認識による高親水性化合物の選択的分離に関する研究

高親水性の天然毒物の選択的分離を目的とし，官能基間距離固定化法を用いて架橋ポリマー基材の分子認識材料を合成し，距離認識の有効性について評価した。

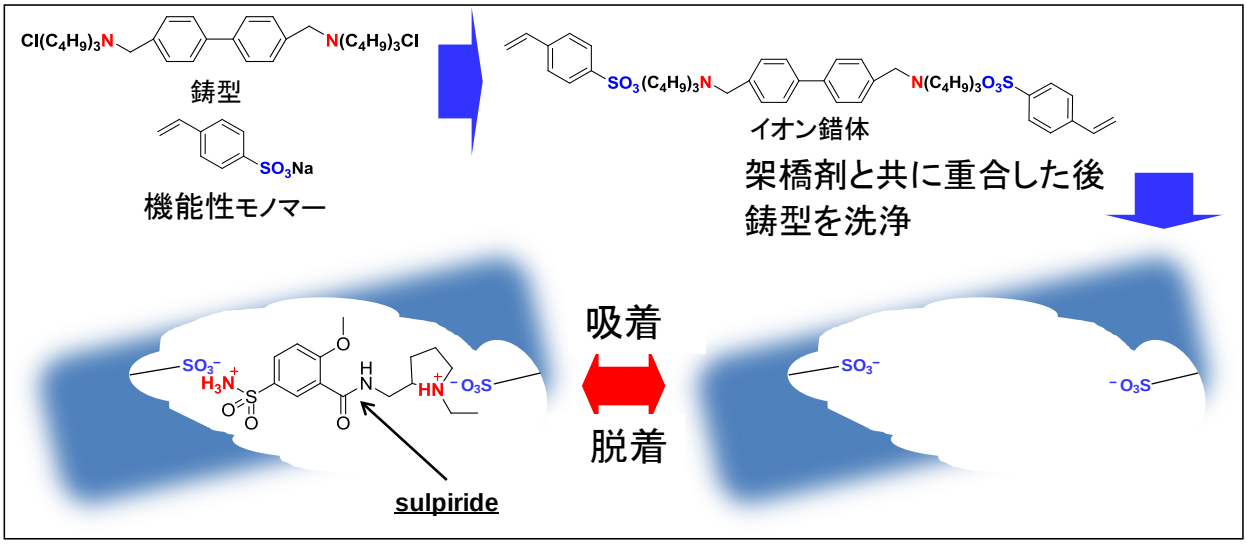
３）残留医薬品の分析前処理を目的とした分子鋳型の開発

本研究では，PPCPsの選択的な捕捉技術開発を目的として，本プロジェクトで研究を進めてきた官能基間距離固定化法[27)28)]を利用して，PPCPsに対して選択的吸着を可能とする新規前処理剤の開

発を目指した。先の報告で，PPCPsの1つであるメトクロプラミド（MCPA）の選択的吸着を試みた結果，認識部位を導入していない場合，MCPAは，基材の極性に関わらず，ほとんど吸着が確認されなかった。一方で，基材表面に距離固定を行うことにより，MCPAに対する選択性が増加することが観察された。そこで，距離固定したポリマーを合成し，様々な条件でMCPAやイオン性化合物に対する吸着性能の評価を行い，距離固定による選択的捕捉が実現可能であるか検討した。

さらに，国内の水環境中で比較的高濃度で検出されている抗うつ剤，スルピリドを対象物質として，分子鋳型に基づく分離剤を合成し，その分析前処理剤としての効果を評価した。一般的な分子インプリント法で得られた分離剤（sulpiride-MIP）および官能基間距離認識に基づく分離剤（I-MIP，図(2)-5参照）をそれぞれ合成し，HPLC用充てん剤として評価することで，分離選択性を比較した。また，SPE剤としての可能性を評価するために，各分離剤充てんカートリッジでのスルピリドの吸着選択性を種々の溶媒を用いて比較した。さらに，実試料分析として，I-MIPを分析前処理カラムとして導入したオンラインSPE-HPLCシステム[29)-31)]を用いて河川試料中のスルピリドの定量を試みた。

本検討では，河川中のPPCP関連物質のモニタリング指標にもなり得るスルピリド[32)-36)]をターゲット物質として，オンラインSPE-HPLCシステムにおける分析前処理でのpptレベルの高感度分析を目的として，新規に分子鋳型を合成しその基礎的な保持選択性および前処理剤としての可能性を評価した。分子鋳型の合成には，一般的に用いられる分子インプリント法および当プロジェクト内で提唱した官能基間距離固定化法の2種類の手法を利用した。得られた分子鋳型をHPLCを用いて評価し，スルピリドに対する潜在的な分子認識能を知るとともに，特に，官能基間距離固定化法で得られた分子鋳型を用いて，オンラインSPE-HPLCシステムで実試料分析を目指した。



図(2)-5　スルピリドに対する距離認識型分子鋳型の概念図

４）光触媒ハイブリッド分子認識材料による高親水性化合物の選択的吸着・分解に関する研究

光分解機能を有する酸化チタンに官能基間距離固定化法を適用することで，選択的吸着・分解能を示す光触媒ハイブリッド分子認識材料を合成し，吸着・分解性能について検討した。

５）多孔性膜と分子鋳型のハイブリッド化技術に関する検討

擬似分子鋳型ハイブリッド膜の開発について，種々の基材多孔体を用いてハイブリッド体を合成し，擬似分子鋳型とのハイブリッド化に最適な条件を見いだすことを本研究の目的とした。

また，EVAを基材とする多孔性樹脂（以下スポンジモノリス）を支持媒体として，ポリマー粒子とのハイブリッド化の形成メカニズムについて評価した。メタクリレート系，dyvinylbenzene（DVB）系の架橋高分子，グラファイトカーボンをハイブリッド化させ，粒子の担持を確認した。さらに，ポリマー粒子のうち，効率的なハイブリッド化が確認された，メタクリレート系の粒子にイオン交換能を付与し，同じくハイブリッド化を確認し，加えて，イオン交換能を定量的に評価した。これらの評価では，ハイブリッド化のメカニズム検証と実証試験を見据えたハイブリッド膜の機能性評価を目的とした。

６）距離認識を利用した伸縮性ヒドロゲルの開発とタンパク質の選択的吸着に関する研究

ポリエチレングリコール基材の伸縮性ヒドロゲルを合成し，距離認識による体積変化の挙動，さらに，タンパク質に対する吸着性能および特異的な体積変化に関して詳細に考察した。

３．研究開発方法

（１）難捕捉有機分子に対する疑似分子鋳型についての検討

１）揮発性有機化合物の選択的吸着に関する研究

a．試薬

用いた試薬および溶媒は，特に断らない限り，市販品をそのまま使用した。実験に使用した水は，Milli-Q純水製造装置（Gradient-A10）を用いて精製した。また，HPLCにおける移動相は全てLC/MS gradeの溶媒を用いた。架橋剤のethylene glycol dimethacrylate (EDMA), divinylbenzene (DVB), glycerol 1,3-dimethacrylate (GDMA)と機能性モノマーのmethacrylic acid (MAA)は和光純薬工業株式会社（Osaka, Japan）から購入し，減圧蒸留により精製した。

b．揮発性有機化合物の選択的吸着に関する研究

ⅰ．溶媒インプリント法を用いたインプリントポリマーの合成

架橋剤，ターゲット分子としての多孔質化溶媒，開始剤の2,2’-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile) (ADVN)をガラス瓶に加え，1時間かく拌した後，5分間窒素置換した。窒素置換後，ガラス瓶を50 ^{o}Cの湯浴に浸漬し，24時間重合した。重合後，得られた架橋ポリマーを粉砕機で粉砕し，106 - 212 μmに分級した。得られた架橋ポリマーをmethanol, acetoneで洗浄することによって多孔質化溶媒や未反応の化合物を除去し，最後に60 ^{o}Cで減圧乾燥し，目的とするporogen imprinted polymer (PIP)を得た。合成したPIPの略号は次の通りに定義した。Chl-ED50は多孔質化溶媒としてchloroform，架橋剤としてEDMAを用い，全体積に占める架橋剤の体積比が50%であることを指す。また，その他の試薬の略号はbenzene (Ben), toluene (Tol), GDMA (GD), DVB (DV)とする。

ⅱ．鋳型分子，機能性モノマーを加えたインプリントポリマーの合成

合成時に鋳型分子，機能性モノマーを加え，ⅰと同様の方法でGas-MIPを合成した。また，比較

として鋳型分子，機能性モノマーを加えないコントロールポリマー(Cont.P)，鋳型分子のみを加えないnon-imprinted polymer (NIP)も同様の方法で合成した。合成したGas-MIPの略号は次の通りに定義した。Tol–MIP (1) は多孔質化溶媒としてtolueneを用い，機能性モノマーのMAAが架橋剤の10 vol%であり，鋳型分子を含むMIPであることを指す。また，その他の試薬の略号はpyridine (Pyri)とする。

c．気相中の揮発性有機化合物に対する吸着性能評価

乾燥した架橋ポリマーを一定量ガラス瓶に加え，VOCが飽和したデシケータ内に静置した。一定時間毎に重量変化を測定し，VOCに対する吸着量を評価した。また，VOCを混合した際の吸着実験方法は以下に示す。

乾燥した架橋ポリマーをガラス瓶に加え，3種類のVOC (chloroform/benzene/toluene = 1/1/1, v/v/v)が飽和したデシケータ内に静置した。3時間後，架橋ポリマーに吸着したVOCをmethanol 10 mLで抽出した。抽出液中のbenzene, toluene量をHPLCで定量し，全吸着量（重量）からbenzene, toluene量を引くことで，chloroformに対する吸着量を算出した。また，評価に用いた相対吸着率の算出式を（2.1）に示す。

$$\text{相対吸着率} = \text{各気体の吸着量} \,/\, \text{全気体吸着量} \qquad (2.1)$$

また， ii で合成したGas-MIPの各VOCに対する吸着実験は上記と同様の方法で行った。一方，toluene, pyridineを混合した際の吸着実験は常圧ではなく減圧下で行った。詳細を以下に示す。乾燥した架橋ポリマーをガラス瓶に加え，toluene, pyridine (1/1, v/v)が飽和したデシケータ内に静置し，ダイヤフラムポンプを用いて60 Torrに調整した。48時間後，架橋ポリマーに吸着したVOCをmethanol 1.0 mLで抽出し，HPLCを用いてpyridineとtolueneに対する吸着量を算出した。benzene, toluene, pyridineのHPLC条件は以下に示す。

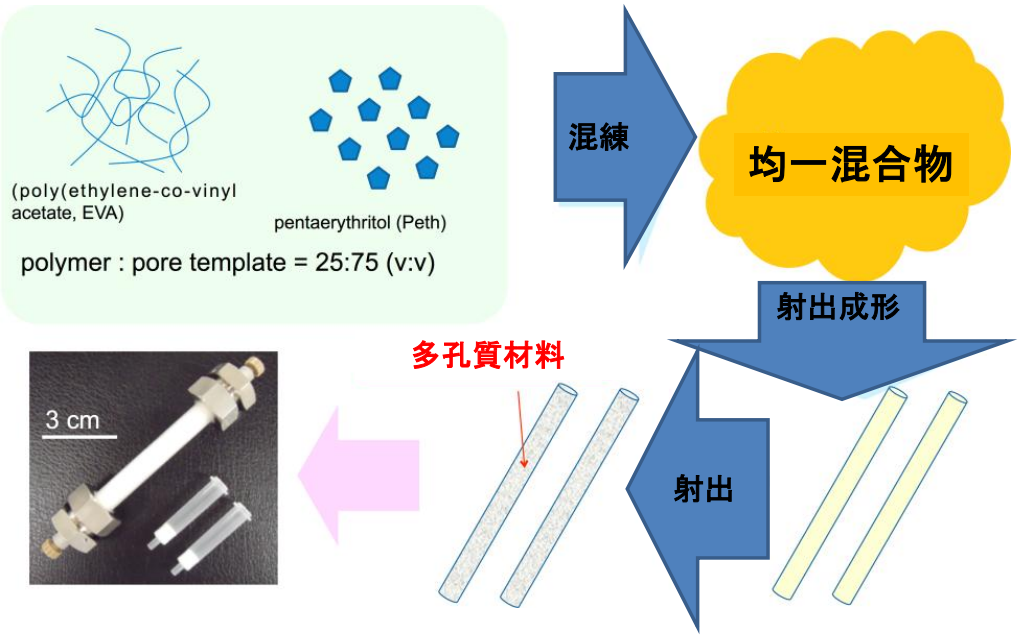
HPLC Condition

Column, Mightysil RP–18 GP (150 × 4.6 mm i.d.); Flow rate, 0.5 mL/min; Mobile phase, 60% acetonitrile aq.; Temperature, 40 ^{o}C; Injection volume, 1.0 μL; Detection, photo diode array (PDA).

２）スポンジモノリスの調製と保持特性

a．スポンジモノリスの合成

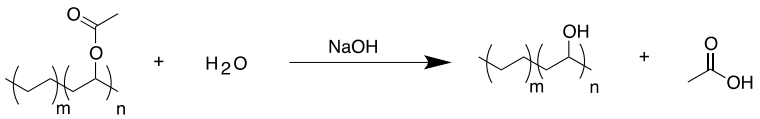
基材ポリマーであるEVA約21 wt%，孔型剤となる水溶性の高分子（pentaerythritol）64 wt%及び15 wt%の助剤 (poly(oxyethylene, oxypropylene) triol)と共に130 ^{o}Cで熱溶解し，混練したのち，外径4.7 mmの円柱状に射出成形した。成形後のポリマーロッドは50% methanol中に浸漬し，減圧下で超音波振とうを行い，水溶性孔型剤を洗浄除去した。得られた高分子多孔体をさらに減圧乾燥し，スポンジモノリスを得た。合成のスキームを図(2)-6に示す。



図(2)-6　EVA スポンジモノリスの合成スキーム

b. スポンジモノリスの加水分解

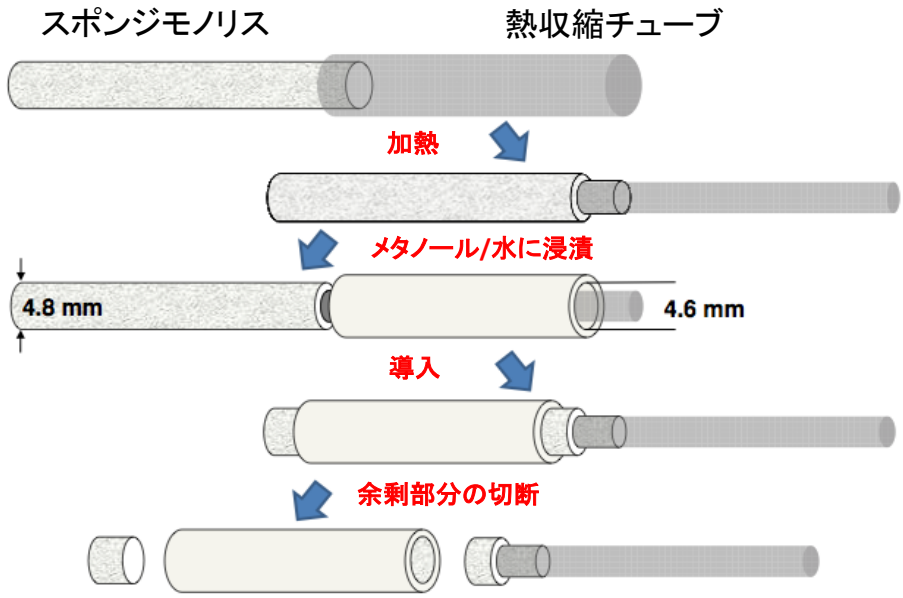
300 mLナスフラスコに6.0 M NaOH aq. 150 mL，methanol 150 mL及びスポンジモノリスを加え，減圧下で5分間超音波処理を行った。次にフラスコ内に窒素を封入し，オイルバス中，65 °Cで24時間加熱還流を行った。反応後，ポリマーを取り出して50%methanol，水で超音波洗浄した後，再度50% methanol溶液に浸漬して12時間かく拌した。得られたポリマーモノリスをmethanolで洗浄し，減圧乾燥して加水分解スポンジモノリスを得た（EVA-HYD）。加水分解の反応スキームを図(2)-7に示す。



図(2)-7　EVAスポンジモノリスの加水分解

c. スポンジモノリスカラムの充てん

スポンジモノリスのカラムへの充てん方法を図(2)-8に示す。カラム内径よりも大きい約4.8 mmの外径を持つスポンジモノリスの末端を熱収縮チューブにより加熱接続した。次にスポンジモノリス全体をmethanolに浸し，熱収縮チューブの末端を内径4.6 mmのステンレスカラムに通した後，そのまま引き込んでスポンジモノリスをカラム内に導入した。この状態でカラムをacetonitrileに浸し，約20分間超音波処理を行った後，両端の余剰スポンジモノリスを切断し，エンドジョイントを取り付けてHPLCカラムとした。



図(2)-8　スポンジモノリスカラムの充てん法

d. スポンジモノリスカラムのHPLC評価条件

評価を行ったスポンジモノリスカラムを以下に示す。カラムサイズは特に付記しない限り，内径4.6 mm，長さ100 mmサイズとし，流速，移動相組成，検出条件等の詳細は図表に付記した。

【スポンジモノリスカラム】
EVA25；酢酸ビニル含量25%のEVAスポンジモノリス
EVA15；酢酸ビニル含量15%のEVAスポンジモノリス
EVA25-HYD；EVA25を加水分解したスポンジモノリス，PE；ポリエチレンスポンジモノリス

【粒子充てんカラム】
EDMA；EDMAを架橋剤モノマーとして合成したポリマー粒子カラム
GDMA；GDMAを架橋剤モノマーとして合成したポリマー粒子カラム
Sil-C_{18}；オクタデシルシリル化シリカゲル粒子カラム

逆相クロマトグラフィーにおけるSilica-C_{18}カラムの分離機構は詳細に解明されており，特定のクロマトグラフィー条件でカラムを評価することで充てん剤の合成で用いられたシリル化剤の官能性やエンドキャップの有無，基材シリカゲルの純度等多くの情報が得られる[37]。ここでは表(2)-2に示すSilica-C_{18}カラムの評価に用いられる分析条件により，スポンジモノリスカラム分離剤の疎水性，立体選択性及び水素結合性の評価を行った。また評価に用いた溶質の化学構造を図(2)-9に示す。

表(2)-2　カラム評価に用いたパラメータとHPLC条件

Parameters	Solutes	Mobile phase
Hydrophobicity, k	k (pentylbenzene)	80% methanol
Hydrophobicity, α (CH_2)	α (pentylbenzene/butylbenzene)	80% methanol
Selectivity of co-planner, α (T/O)	α (triphenylene/*o*-terphenyl)	80% methanol
Hydrogen bonding, α (C/P)	α (caffeine/phenol)	30% methanol

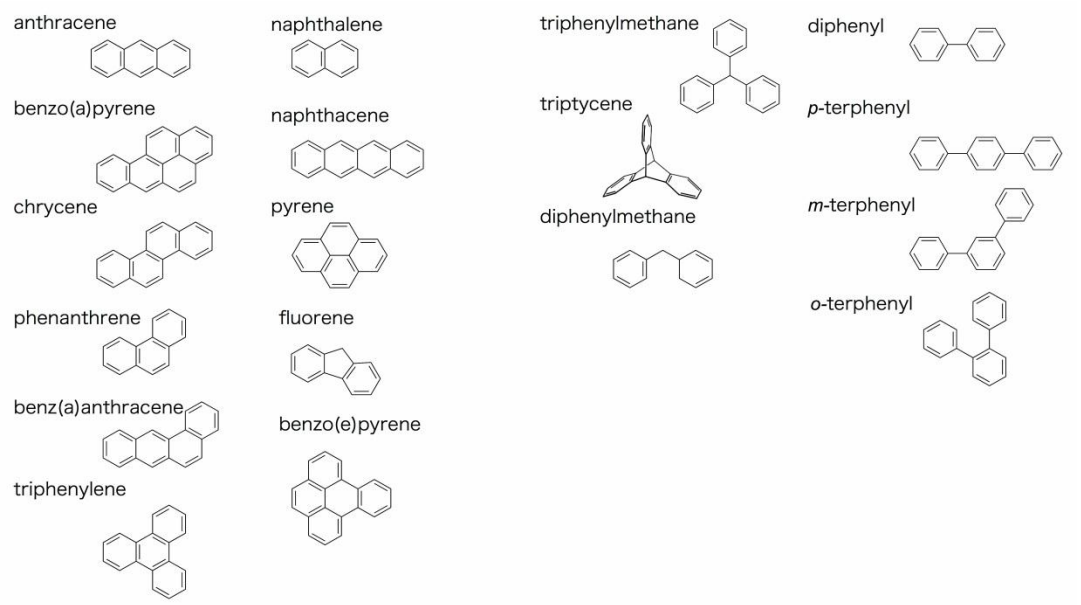
尚，保持係数：k，分離係数：αは次式から求めた。

$k = (t_r - t_0) / t_0$　　（2.2）　　t_r：試料の溶質時間，t_0：非保持の試料の溶質時間

$\alpha = k_1 / k_2$　　（2.3）　　k_1：溶質1の保持係数，k_2：溶質2の保持係数

【評価に用いた溶質の化学構造】

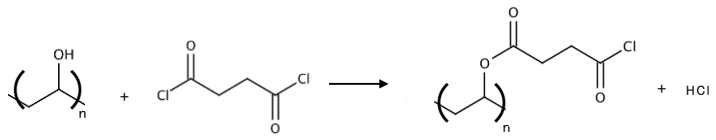
（A）平面構造を持つ溶質群　　（B）立体的にかさ高い溶質群



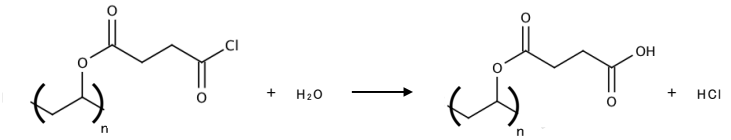
図(2)-9　カラムの保持特性評価に使用した溶質18成分

e．2塩基酸クロライドによる表面修飾

10 mL acetonitrileに使用した加水分解スポンジ中（EVA-HYD）の水酸基モル数のおよそ20倍量となるsuccinyl chloride（3.870 mL）を加えてかく拌し，加水分解スポンジを浸漬した（溶液1）。次に10 mL acetonitrileに使用した加水分解スポンジ中の水酸基に対して20当量となるtriethylamine（9.466 mL）を加えた溶液（溶液2）を溶液１に氷冷下で滴下した。滴下終了後，反応液を室温に戻し，24時間かく拌，反応させた（図(2)-10）。その後，50% acetonirtile aq.にスポンジモノリスを浸漬し，超音波振とう（20 min）を6回繰り返して洗浄した（図(2)-11）。さらにスポンジモノリスをacetonitrileで洗浄・乾燥し，目的のスポンジモノリスEVA15-HYD-SCCを得た（反応率61.9%）。



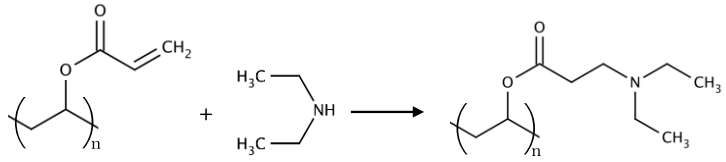
図(2)-10　ポリマー表面上のヒドロキシル基とsuccinyl chlorideの反応



図(2)-11　ポリマー表面へのカルボン酸の導入

f. ジエチルアミノ化スポンジモノリスの調製

10 mLのdimethylformamideに加水分解スポンジ中水酸基のおよそ20当量となるacrylyl chloride (AC), 12.4 mLを加えてかく拌，浸漬した（溶液1）。次に10 mLのdimethylformamideに，加水分解スポンジ中水酸基のおよそ20当量となるpyridine12.3 mL を加えてかく拌した溶液（溶液2）を溶液1に氷冷下で滴下した。滴下終了後，60 °Cで48時間かく拌，反応させた。その後，50% acetonirtile aq.にスポンジモノリスを浸漬し，超音波振とう20 minを6回繰り返した。さらにスポンジモノリスをacetonitrileで洗浄・乾燥し，目的のスポンジモノリス（EVA25-HYD-AC）を得た。次にacrylyl chlorideで修飾したスポンジモノリスをフラスコ内で30 mLのジエチルアミンに浸漬し，48時間室温でかく拌，反応した。得られたスポンジモノリスをacetonitrileに浸漬し，超音波振とう（20 min）を6回繰り返し洗浄・乾燥し，目的のスポンジモノリス（EVA25-HYD-AC-DEA）を得た（図(2)-12）（全OH基に対する反応率16.0 %）。



図(2)-12　ポリマー表面へのジエチルアミンのマイケル付加

３）PCBの選択的分離を目的としたスルホキシド含有型分子インプリント固相剤の開発
～油中PCBの捕捉について～

検討に際して使用した試薬を，以下に示す。

・重合開始剤：ADVN

・多孔質化溶媒 : xylene（3異性体混合品）, pentamethylbenzene (PMB), dichlorobenzene (1,3-DB）, trichlorobenzene (1,3,5-TB）

・架橋剤：DVB，GDMA，EDMA

・機能性モノマー：chloromethyl styrene (CMS)，phenyl vinyl sulfoxide (PVS)

・その他 : dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium iodide (NaI), thiophenol, potassium hydroxide (KOH), hydrogen peroxide (H_2O_2)

・PCB標準品：関東化学　T-PCB Cleanup Spike , Syringe Spike , Sampling Spike
（$^{13}C_{12}$ Labeled mixture nonane solution）

a．基材ポリマーの合成

最初に3種類のモノマーと2種類の多孔質化溶媒を用いて基材ポリマーの合成を行った。この合成は，基材ポリマーを合成した後に，スルホキシドを導入する2段階の合成で行った。合成条件は，表(2)-3に示す。また合成手順は以下に示すとおりである。

ⅰ．試験管に重合開始剤として ADVN，鋳型分子として xylene or PMB，架橋剤として DVB or EDMA or GDMA，機能性モノマーとして CMS を計量，かく拌したあと，60 °C のウォーターバス中で 24 時間重合した。

ⅱ．脱型し，acetone で洗浄し，65 °C で減圧乾燥した。

ⅲ．粉砕し，methanol と acetone で洗浄し，70 °C で減圧乾燥した。

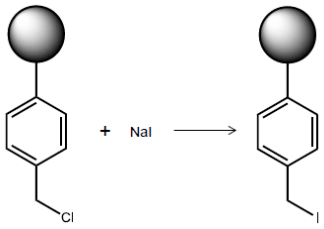
ⅳ．106-212 mm に分級し，基材ポリマーを作製した。

表(2)-3　基材ポリマーの合成条件

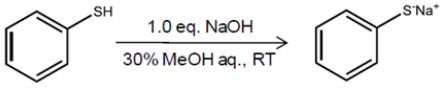
	xylene(ml)	PMB(ml)	monomer(ml)	CMS(ml)	ADVN(mg)
DVB-base4	8.0	―	4.0	4.0	160
EDMA	4.75	―	4.0	0.75	95
GDMA	4.75	―	4.0	0.75	94
DVB-PMB	―	4.59	4.0	1.0	100

b．スルホキシド固相の作製と分画試験

ⅰ．DMSO にハロゲン化合物（NaI）を溶解し，分級した基材ポリマーを加え，80 °C のオイルバス中で反応させた（図(2)-13，反応 1）。その後，thiophenol に 30% methanol aq. ，KOH aq. 1.0 mol/L を加え，かく拌し，10 分間反応させた（図(2)-14，反応 2）。

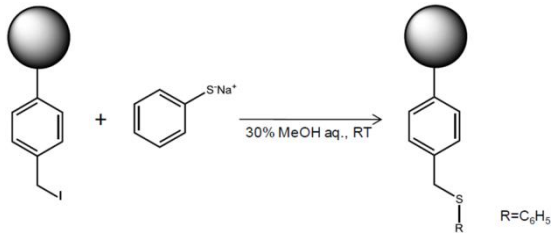


図(2)-13　反応1

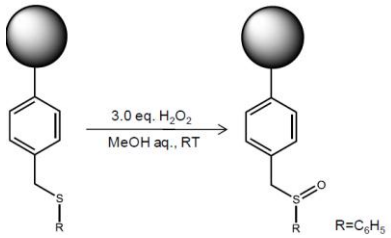


図(2)-14　反応2

ⅱ．反応 1 の基材ポリマーに，反応 2 の thiophenol を 10 分おきに 3 回加え，3 時間反応させた（図(2)-15，反応 3）。反応後，洗浄と乾燥を行い，ポリマーを得た。得られたポリマーを methanol aq.，H_2O_2 3.0 mol/L に浸漬し，酸化させた（図(2)-16，反応 4）。



図(2)-15　反応3



図(2)-16　反応4

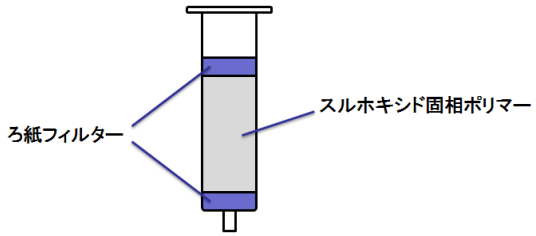
iii．反応後，洗浄と乾燥を行い，スルホキシド固相ポリマーを得た。スルホキシド固相ポリマーの組成比を表(2)-4 に示す。Cl に対して，potassium iodide を 1 当量，thiophenol を l 当量及び potassium hydroxide を 2 当量加えた。

表(2)-4　固相ポリマーの組成比

	monomer			potassium hydroxide (mmol)	thiophenol (mmol)	potassium iodide (mmol)
	(ml)	d (g/ml)	Cl (mmol)			
DVB-base4	4.0	0.914	6.0	12.0	12.0	6.0
EDMA	4.0	1.05	6.0	12.0	12.0	6.0
GDMA	4.0	1.12	6.0	12.0	12.0	6.0
DVB-PMB	4.0	0.914	6.0	12.0	12.0	6.0

iv．前処理カラムの作製

乾燥したスルホキシド固相ポリマーを，長さ52 mm × 内径9.0 mmのポリプロピレンカラムに詰め，前処理カラムを作製した（図(2)-17）（ポリマー充てん量：0.75 g）。



図(2)-17　作製したカラム

v．分画試験

・カラムの上にディスポシリンジを接続し，展開する溶媒を入れた。はじめに，カラムをacetone 10 mL，hexane 20 mLにて洗浄してから使用した。絶縁油またはPCB標準品をカラムに添加したあと，hexaneで2.0 mLずつ分画した。

・絶縁油の溶出試験

作製したカラムにおける絶縁油（鉱油）の溶出状況を確認するため，フラクション毎にガスクロマトグラフ（水素炎イオン検出器：FID (Flame Ionization Detector)）で下記の条件により絶

縁油の溶出の確認を行った。

GC (FID)：島津製作所　GC-2010 (FID)
分離カラム：J&W DB-5ms　0.32 mm (ID) × 30 m，注入量：1.0 μL，注入口：200 °C
昇温条件：160 °C（2 min）→ 20 °C／min → 320 °C（20 min）

・PCBの溶出状況確認試験

作製したカラムにおけるPCBの溶出状況を確認するため, 各フラクション毎に下記の装置と条件で絶縁油の溶出の確認を行った。四重極GCMSを用いて下記の装置と条件で絶縁油の溶出の確認を行った。GCMS測定条件[38)]は，以下に示すとおり。

GCMS：Agilent 5975C MSD
分離カラム：J&W DB-5ms　0.32 mm (ID) × 30 m　注入量：1.0 μL，注入口：300 °C
昇温条件：　70 °C (1.5 min)→ 30 °C／min→ 185 °C → 6.0 °C／min→300 °C
測定イオン：m/z = 35.37 イオン源：250 °C
イオン化モード：NICI (negative ion chemical ionization)
反応ガス：メタンガス（純度99.999 %以上）

c．共重合法による基材ポリマーの合成

次に，基材ポリマーの合成時にスルホキシドを持つモノマーと同時に重合する方法を試みた。2種類のモノマーと3種類の多孔質化溶媒を用いて基材ポリマーの合成を行った。合成条件は，表(2)-5に示す。また合成手順は以下に示すとおり。

ⅰ．試験管に重合開始剤としてADVN，多孔質溶媒としてxylene or 1,3-DB or 1,3,5-TB，架橋剤としてDVB or EDMA，機能性モノマーとしてCMS or PVSを各々計量し，かく拌したあと，60 °Cのウォーターバスで24時間重合した。
ⅱ．脱型し，acetoneで洗浄し，65 °Cで減圧乾燥した。
ⅲ．粉砕し，methanolとacetoneで洗浄し，70 °Cで減圧乾燥した。
ⅳ．106 - 212 mm に分級し，基材ポリマーを作製した。

表(2)-5　基材ポリマーの合成条件

略号	基材	monomer	多孔質化溶媒
DV-Xy	DVB	CMS	xylene (Xy)
DV-DB	DVB	CMS	1,3-dichlorobenzene (DB)
DV-TB	DVB	CMS	1,3,5-trichlorobenzene (TB)
ED-Xy	EDMA	CMS	xylene (Xy)
ED-DB	EDMA	CMS	1,3-dichlorobenzene (DB)
ED-TB	EDMA	CMS	1,3,5-trichlorobenzene (TB)
DV-Xy-S	DVB	PVS	xylene (Xy)
DV-DB-S	DVB	PVS	1,3-dichlorobenzene (DB)
DV-TB-S	DVB	PVS	1,3,5-trichlorobenzene (TB)
ED-Xy-S	EDMA	PVS	xylene (Xy)
ED-DB-S	EDMA	PVS	1,3-dichlorobenzene (DB)
ED-TB-S	EDMA	PVS	1,3,5-trichlorobenzene (TB)

また，合成について表(2)-6の通りおこなった。

表(2)-6　基材ポリマーの合成条件

	Xylene	1,3-DB	1,3,5-TB	monomer (DVB)	monomer (EDMA)	CMS	PVS	ADVN
DV-Xy	10.0 mL (81.1 mmol)	-	-	8.0 mL (56.2 mmol)	-	2.0 mL (14.1 mmol)	-	200 mg
DV-DB	-	8.0 mL (68.1 mmol)	-	8.0 mL (56.2 mmol)	-	2.0 mL (14.1 mmol)	-	200 mg
DV-TB	-	-	7.0 mL (52.3 mmol)	8.0 mL (56.2 mmol)	-	2.0 mL (14.1 mmol)	-	200 mg
ED-Xy	10.0 mL (81.1 mmol)	-	-	-	8.0 mL (42.4 mmol)	1.6 mL (11.2 mmol)	-	190 mg
ED-DB	-	8.0 mL (68.1 mmol)	-	-	8.0 mL (42.4 mmol)	1.6 mL (11.2 mmol)	-	190 mg
ED-TB	-	-	7.0 mL (52.3 mmol)	-	8.0 mL (42.4 mmol)	1.6 mL (11.2 mmol)	-	190 mg
DV-Xy-S	10.0 mL (81.1 mmol)	-	-	8.0 mL (56.2 mmol)	-	-	1.9 mL (14.7 mmol)	200 mg
DV-DB-S	-	8.0 mL (68.1 mmol)	-	8.0 mL (56.2 mmol)	-	-	1.9 mL (14.7 mmol)	200 mg
DV-TB-S	-	-	7.0 mL (52.3 mmol)	8.0 mL (56.2 mmol)	-	-	1.9 mL (14.7 mmol)	200 mg
ED-Xy-S	10.0 mL (81.1 mmol)	-	-	-	8.0 mL (42.4 mmol)	-	1.4 mL (10.5 mmol)	190 mg
ED-DB-S	-	8.0 mL (68.1 mmol)	-	-	8.0 mL (42.4 mmol)	-	1.4 mL (10.5 mmol)	190 mg
ED-TB-S	-	-	7.0 mL (52.3 mmol)	-	8.0 mL (42.4 mmol)	-	1.4 mL (10.5 mmol)	190 mg

d. 固相の作製と分画試験

上記と同様の方法に従い，合成した固相剤を用いた固相カラムの作製，分画試験，溶出試験を行った。

（２）難捕捉高親水性物質に対する疑似分子鋳型についての検討

１）高親水性化合物のためのトラップ層開発の検討

a. 基材ポリマー粒子の合成

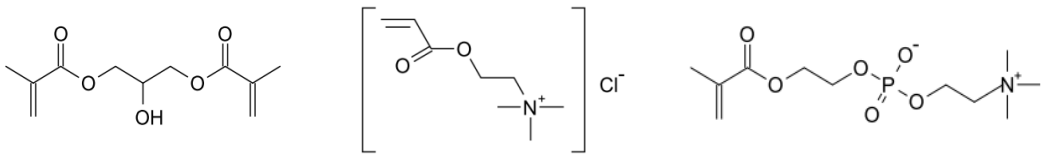
基材ポリマー粒子は，多段階膨潤重合法を用いて合成した。最初に，ソープフリー乳化重合により，ポリスチレン種粒子の合成を行った。次に，架橋剤としてGDMA 5.0 mL，多孔質化溶媒としてtoluene 5.0 mL，開始剤としてADVN 0.15 gを用い，70 °Cで24時間重合を行った。重合後，水，methanol，tetrahydrofuranを用いて洗浄を行った。

b. ポリマー粒子の修飾

作製したポリマー粒子 2.0 gをmethanol 100 mLに分散し，機能性モノマー0.75 gおよび開始剤ADVNを溶解し，70 °Cで24 時間反応を行った。反応後，methanolで洗浄を行った。機能性モノマーとしては，*N*,*N*-dimethylamino ethylacrylate, methyl chloride quarternary (DMAEA-Q) と，2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC monomer）を用いた。

c. HPLCを用いたポリマー粒子の評価

修飾をしていないGDMA粒子と，2種類の修飾を施したGDMA粒子（DMAEA-Q, MPC）の表面状態を走査型電子顕微鏡（SEM）を用いてそれぞれ観察した。その後，作製したポリマー粒子をステンレスカラム（100 mm × 4.6 mm i.d.）に充てんし，HPLCを用いてその保持特性の評価を行った（図(2)-18）。



GDMA　　DMAEA-Q　　MPC monomer

図(2)-18　GDMAと修飾に用いたモノマーの構造と略号

２）官能基間距離認識による高親水性化合物の選択的分離に関する研究

a. 試薬

架橋剤のtributylamineは和光純薬工業株式会社（Osaka, Japan）から購入し，減圧蒸留により精製した。その他の試薬は，市販品をそのまま使用した。

b. 鋳型分子の合成

α,*α*’-dichloro-*p*-xylene or 4,4'-bis(chloromethyl)biphenylとtributylamineをacetonitrileに溶解し，オイ

ルバスを用いて窒素雰囲気下100 ºCで還流しながら24時間反応した。反応終了後，沈殿物を濾別しacetonitrileを用いてろ過洗浄した後, デシケータで減圧乾燥し, 目的物質である4-(tributylammonium-methyl)-benzyltributylammonium chloride (TBTA) or 4,4’-bis(tributylammoniummetyl chloride)biphenyl (BTAB)を得た。

c．イオン結合型錯体の合成

鋳型分子と機能性モノマーの*p*-styrene sulfonic acid (SSA)を水に溶解し，イオン結合型錯体をchloroformで抽出し，抽出液から溶媒を減圧除去し，目的物質であるイオン結合型錯体を得た。合成したイオン結合型錯体は, TBTA-SSA, BTAB-SSA, benzyltributylammonium chloride (BTBA)-SSA, tetrabutylammonium chloride (TBA)-SSAの4種類である。

d．距離固定ポリマーの調製

Interval immobilization polymer (IIP)の基材となるCont.Pの調製は多段階膨潤重合法を用いた。ここで，架橋剤はEDMA，多孔質化溶媒はchloroformを用いた。次に，イオン結合型錯体とADVNをmethanolに溶解し，Cont.Pを分散させたmethanolに加え，窒素雰囲気下64 ºCで還流しながら24時間反応した。反応終了後，methanolで洗浄し，ろ過および減圧乾燥し，目的とするIIPを得た。ここで，イオン結合型錯体は，スルホ基量が等しくなるように加えた。

e．コントロールポリマーのビニル基量と平均ビニル基間距離の算出

1.7 mLのエッペンドルフチューブにCCl_4 1000 μL, Br_2 10 μL, Cont.P 0-1.0 gを加え，室温で一晩かく拌した。かく拌後，遠心分離によって上澄み溶液を回収した。回収した上澄み溶液をCCl_4で20倍希釈し，吸光光度計を用いて415 nmの波長で吸光度を測定した。本項では，臭素溶液の濃度を一定にし，Cont.P量を変化させることで，検量線を作成した。

f．フロンタル解析

HPLC用カラムに充てんしたTBTA-Pにmethanol/1.0 M NaCl aq. (1/1, v/v), 70% methanol aq.を順に通液し，鋳型分子を完全に除去した。次に，一定濃度の鋳型分子を溶解した移動相を通液し，鋳型分子の検出時間から，結合に関与しているイオン性官能基の量，また結合状態を評価した。以下にHPLC条件を示す。

<u>HPLC conditions</u>

Column size, 100 mm × 4.6 mm i.d.; Flow rate, 0.2 mL/min; Mobile phase, methanol/0.4 M NaCl aq. = 70/30; Temperature, 30 ºC; Concentration of template molecule, 500 ppm; Detection, PDA.

g．バッチ吸着による吸着等温解析

まず，0.25-500 μMのTBTA溶液（70% methanol aq.）を調製した。次に，調製したTBTA溶液1.0 mLとIIP 10 mgをエッペンドルフチューブに加え，室温で12時間かく拌した。かく拌後，遠心分離を行い, 上澄み溶液に含まれるTBTA量をLC/MSを用いて定量した。以下にLC/MS条件を示す。また，以後のTBTAの分析は全て同条件で行った。

HPLC conditions

Column, Inertsil®ODS–3 (150 mm × 2.1 mm i.d.); Flow rate, 0.2 mL/min; Mobile phase, acetonitrile/0.1% Formic acid aqueous = 90/10; Temperature, 40 °C; Injection volume, 1.0 μL.

MS conditions

Ionization, ESI; Polarity, Positive; Interface voltage, +4.5 kV; Interface temperature, 200 °C, CDL voltage, 50 V; CDL temperature, 250 °C; Heat block temperature, 200 °C; Drying gas, 0.1 Mpa; Nebulizer gas, N_2 (1.5 L/min); Monitoring, SIM (237.75 m/z).

h．サキシトキシンの同族体を用いたバッチ吸着実験

まず，dcSTX 0.50 mL，水 1.75 mL，acetonitrile 5.25 mLを混合し，dcSTX溶液（70% acetonirtile aq.）を調製した。次に，dcSTX溶液 1.5 mLとIIP 10 mgをエッペンドルフチューブに加え，室温で24時間かく拌した。吸着反応終了後，遠心分離を行い，上澄み溶液に含まれるdcSTX量をLC/MSを用いて定量した。以下にLC/MS条件を示す。また，以後のdcSTXの分析は全て同条件で行った。

HPLC conditions

Column, TSK-gel Amide-80 (150 mm × 2.0 mm i.d.); Flow rate, 0.2 mL/min; Mobile phase A, 3.6 mM Formic acid, 2.0 mM Ammonium formate (pH3.5); Mobile phase B, A/acetonitrile = 5/95 (B:80%→55% linear gradient 0 min to 20 min); Temperature, 40 °C; Injection volume, 10 μL.

MS conditions

Ionization, ESI; Polarity, Positive; Interface voltage, +4.5 kV; Interface temperature, 200 °C, CDL voltage, 50 V; CDL temperature, 250 °C; Heat block temperature, 200 °C; Drying gas, 0.1 Mpa; Nebulizer gas, N_2 (1.5 L/min); Monitoring, SIM (257 m/z).

３）残留医薬品の分析前処理を目的とした分子鋳型の開発

a．ポリマー粒子の合成

本研究では，多段階膨潤重合法を用いて，ポリマー粒子の合成を行った。まず，ソープフリー乳化重合により，ポリスチレン種粒子の合成を行った。次に，架橋剤としてEDMA，多孔質化溶媒としてtoluene，開始剤として2.0 wt%のラジカル重合開始剤を用いて，50 °C，24 時間重合を行った。重合後，水，methanol，tetrahydrofuranで洗浄を行い，目的とするポリマー粒子（BASE）を得た。得られたポリマー粒子は，粒子径均一であり，粒子径は約5.0 μmであった。

b．分散法によるイオン性官能基の導入

EDMA粒子2.0 gをmethanol 100 mLに分散し，鋳型分子（図(2)-19）と機能性モノマーSSAのイオン結合型錯体および開始剤を溶解した。アルゴンガスでバブリングし，65 °Cで24 時間反応を行った。反応後，methanolで洗浄することにより，目的とするポリマー粒子を得た。合成したポリマーの組成と略号を表(2)-7に示す。

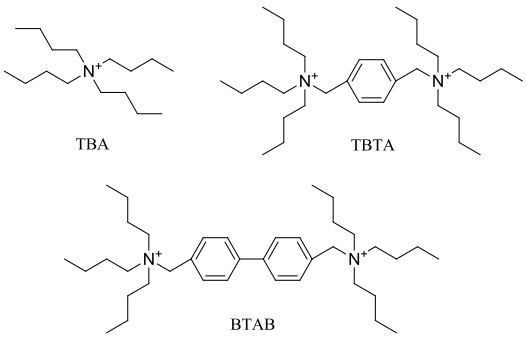
c．合成したポリマー粒子のHPLC評価

合成したポリマー粒子は，HPLC用カラム（100 mm × 4.6 mm i.d.）に充てんし，methanol/1.0 M NaCl

aq.（50/50, v/v）を通液し，鋳型分子を完全に除去した後，50% methanol aq.でNaClを除去し，HPLC評価を行った。

表(2)-7　合成したポリマー粒子の組成と略号

略号	ポリマー粒子	鋳型分子	イオン結合型錯体	開始剤
BLANK	**EDMA** 2.0 g	TBA	42.99 mg (0.10 mmol)	ADVN 0.1 g
TBTA-P		TBTA	42.48 mg (0.05 mmol)	
BTAB-P		BTAB	45.87 mg (0.05 mmol)	



図(2)-19　鋳型分子の構造

d. ポリマー粒子の合成（スルピリド）

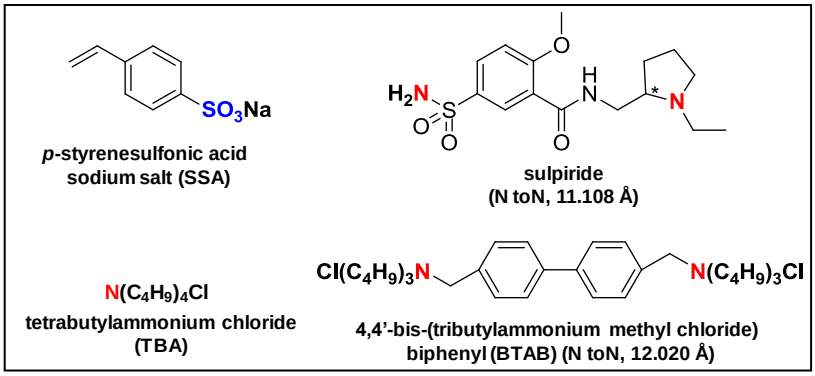
従来の分子インプリント法を用いる手法では，架橋剤にEDMA，鋳型分子にスルピリド，機能性モノマーにMAA，開始剤にはADVN，多孔質化溶媒にtolueneを用い，多段階膨潤重合法によって均一径ポリマー粒子を合成した。組成を表(2)-8に示す。得られたポリマー粒子をHPLC用カラムに充てんし，ギ酸緩衝液を含む移動相を流すことで，鋳型分子を除去した。

表(2)-8　分子インプリント法により合成したポリマー粒子の組成.

	Crosslinker 26.5 mmol	**Template 0.56 mmol**	**Monomer 4.48 mmol**
NIP	EDMA	------	MAA
sulpiride-MIP	EDMA	sulpiride	MAA

次に，官能基間距離固定化法を用いる手法では，まず，基材ポリマーとして，EDMAのみをモノマーとして用いたポリマー粒子を合成した。EDMA粒子5.25 gに対して，TBA, 1 mmolもしくはBTAB, 2 mmolとSSAのイオン結合型錯体を用いて，反応させた（図(2)-20）。合成手順は次の通りである。

ⅰ)EDMAポリマー粒子を少量のmethanol中に分散，ⅱ)イオン結合型錯体を少量のmethanolに溶解し，ⅰ)と混合，ⅲ)水を加え，全体が水richになるように調整，ⅳ)105 °Cのオイルバスで加熱，昇温後，水に溶解した$K_2S_2O_8$を混合，ⅴ)窒素雰囲気下105 °Cで24時間，還流，ⅵ)還流後，methanolで洗浄し，減圧乾燥，ⅶ)HPLC用カラムに充てん後，含NaCl移動相で脱鋳型。距離固定型の分子鋳型，MIP-IおよびNIP-Iを得た。



図(2)-20　距離固定化法での分子鋳型合成に用いた試薬

e．評価

上記で得られたカラムについてHPLCを用いて保持選択性を評価した。移動相には，acetonitrileおよび種々のpHの緩衝液を用いた。また，各ポリマー粒子をSPE用ポリプロピレン製カートリッジに充てんし，スルピリド水溶液の吸着挙動を評価し，さらに，オンラインSPE-HPLCシステムの前処理カラムとしての可能性を評価した。

４）光触媒ハイブリッド分子認識材料による高親水性化合物の選択的吸着・分解に関する研究

a．試薬

用いた試薬および溶媒は，特に断らない限り，市販品をそのまま使用した。AEROXIDE® TiO_2 P25（P25，比表面積，55.9 m2/g；平均粒子径，15 nm）は日本アエロジル株式会社（Tokyo, Japan）から提供して頂き，そのまま使用した。

b．間接法によるハイブリッド材料の合成

VTMSと酢酸水溶液を混合し，室温で15分かく拌し，シランカップリング溶液を調製した。次に，P25と90% EtOH aq.を混合し，超音波振とうによりP25を完全に分散し，スラリー状にした。スラリー状のP25にシランカップリング溶液を加え，3時間かく拌し，遠心分離によって，シランカップリング剤を修飾したP25-SCを回収し，120 ºCのオーブンで60分間乾燥した。次に，ALS 34.7 mg（2.39×10^{-4} mol）とTBTA 65.3 mg（1.20×10^{-4} mol）を少量の水に溶解し，室温で120分間かく拌した。かく拌後，P25-SC 1.0 g, 67% methanol aq. 300 mLを加え，10分間超音波振とうし，P25-SCを分散した。次に，少量の水に溶解したADVN 0.10 gを加え，窒素雰囲気下70 ºCで還流しながら24時間反応した。反応終了後，遠心分離により沈殿物を回収し，120 ºCのオーブンで60分間乾燥し，目的とするハイブリッド材料（P25-SC-AL-TB）を得た。また，鋳型分子を加えないハイブリッド材料（P25-SC-AL）も同様の方法で合成した。

c．直接法によるハイブリッド材料の合成

まず，HESA 0.11 g（0.74 mmol）とTBTA 0.20 g（0.37 mmol）を水に溶解し，室温で3時間かく拌した。かく拌後，水300 mLに分散したP25 1.0 gを加え，さらに3時間かく拌した。かく拌後，遠心分離（4000 rpm, 30分間）により沈殿物を回収し，120 ºCのオーブンで60分間乾燥し，目的とす

るハイブリッド材料（P25-HE-TB）を得た。また，鋳型分子を加えないハイブリッド材料（P25-HE）も同様の方法で合成した。

d. ハイブリッド材料の吸着性能評価

まず，1.7 mLのエッペンドルフチューブにハイブリッド材料10 mg, BETA（or TBTA）水溶液1.0 mLを混合した。次に，超音波振とうによりハイブリッド材料を完全に分散させた。分散後，室温で12時間かく拌し，上澄み溶液のBETA（or TBTA）量をLC/MSで定量した。BTEA（or TBTA）のLC/MS条件を以下に示す。

HPLC Conditions

Column, YMC–Pack ODS–AM (75 × 4.6 mm i.d.); Flow rate, 0.2 mL/min; Mobile phase, methanol/0.2% Formic acid = 70/30; Temperature, 40 ^{o}C, Injection volume, 1.0 μL.

MS conditions

Ionization, ESI; Polarity, Positive; Interface voltage, +4.5 kV; Interface temperature, 200 ^{o}C, CDL voltage, 50 V; CDL temperature, 250 ^{o}C; Heat block temperature, 200 ^{o}C; Drying gas, 0.1 Mpa; Nebulizer gas, N_2 (1.5 L/min); Monitoring, SIM (BTEA, 192.15 m/z; TBTA, 237.75 m/z).

e. ハイブリッド材料の吸着・分解性能評価

石英ビーカーにハイブリッド材料とMB水溶液を加え，超音波振とうし，ハイブリッド材料を分散した。分散後，室温でかく拌しながら，UV照射（365 nm）し，一定時間毎に溶液を一定量ずつ回収し，LC/MSで上澄み溶液中のMB量や分子量の変化を測定した。また，TBTA，ムラサキイガイ抽出液に溶解したdcSTXも同様の方法で評価した。MB（or dcSTX）のLC/MS条件を以下に示す。

HPLC Conditions (MB)

Column, Zic–HILIC (150 mm × 2.0 mm i.d.); Flow rate, 0.2 mL/min; Mobile phase, acetonitrile/0.05% Formic acid = 50/50; Temperature, 40 ^{o}C, Injection volume, 1.0 μL.

MS conditions (MB)

Ionization, ESI; Polarity, Positive; Interface voltage, +4.5 kV; Interface temperature, 200 ^{o}C, CDL voltage, 50 V; CDL temperature, 250 ^{o}C; Heat block temperature, 200 ^{o}C; Drying gas, 0.1 Mpa; Nebulizer gas, N_2 (1.5 L/min); Monitoring, Full scan (0 - 300 m/z).

HPLC conditions (dcSTX)

Column, TSK-gel Amide-80 (150 mm × 2.0 mm i.d.); Flow rate, 0.2 mL/min; Mobile phase A, 3.6 mM Formic acid, 2.0 mM Ammonium formate (pH3.5); Mobile phase B, A/acetonitrile = 5/95 (B:80%→55% linear gradient 0 min to 20 min); Temperature, 40 ^{o}C; Injection volume, 10 μL.

MS conditions (dcSTX)

Ionization, ESI; Polarity, Positive; Interface voltage, +4.5 kV; Interface temperature, 200 ^{o}C, CDL voltage, 50 V; CDL temperature, 250 ^{o}C; Heat block temperature, 200 ^{o}C; Drying gas, 0.1 Mpa; Nebulizer gas, N_2 (1.5 L/min); Monitoring, SIM (257 m/z).

５）多孔性膜と分子鋳型のハイブリッド化技術に関する検討

a．試薬（基礎評価）

・EDMA粒子（以下，単に粒子と記す）

・0, 5, 10, 15, 20, 25% methanol 水溶液（0, 5, 10, 15, 20, 25% methanol aq.），100 ppm BPA（25% methanol aq.で調製した），9G粒子含有ポリマー（9G-0%, 9G-30%），TEGVE粒子含有ポリマー（TEGVE-0%, TEGVE-30%），ウレタン粒子含有ポリマー（ウレタン-0%, ウレタン-30%），スポンジモノリス粒子含有ポリマー（スポンジモノリス-0%, スポンジモノリス-30%），Epoxy-26-1, Epoxy-26-2粒子含有ポリマー（Epoxy-26-1-0%, Epoxy-26-1-30%, Epoxy-26-2-0%, Epoxy-26-2-30%）（いずれもモノマー比率26%, Epoxy-26-1では細孔径が約1.0 μm, Epoxy-26-2では約2.0-3.0 μm）

b．粒子含有ポリマーによるBPAバッチ吸着実験

粒子 3.0 mg, 各粒子含有ポリマー10 mgを蓋付きのガラス管（20 mL）にはかりとり, 100 ppm BPA溶液 20 mLを加え，1分間超音波にかけた後，25.5 ºC，スターラーを用いて24時間かく拌した。

かく拌時間24時間後に，スピンダウン後の上澄み液を20 μL採取し，HPLCで2回分析した。得られた面積値から，BPA吸着率を計算した。さらに，基材ポリマーに対する含有した粒子の吸着能を（2.4）の式を用いて計算した。これらの値は9G，TEGVEに関しては同じ実験を3回繰り返した平均値，その他のポリマーに関しては，同じ実験を4回繰り返し，エラーと考えられる結果を除した3回分の平均値から求めた。

基材ポリマーに対する含有した粒子の吸着能=（粒子含有率30%のBPA吸着率－粒子含有率0%のBPA吸着率の0.7倍）/ 粒子含有率0%のBPA吸着率の0.7倍　　（2.4）

なお，基材ポリマーの特性を考慮して，ウレタン，スポンジモノリス，エポキシ系粒子含有ポリマーに関しては，BPA溶液とのかく拌を行う前に以下のコンディショニングを行った。

ウレタン，スポンジモノリス，エポキシ系粒子含有ポリマーに，methanolを2.0 mL加え，30 min室温で放置した。methanolを除去し，25% methanol aq.を20 mL加え，減圧下で1時間静置した。1時間ごとに25% methanol aq.の交換を計2回行った。3回目に25% methanol aq.を，出来る限り除去した後，所定のBPA溶液を加え，バッチ吸着実験を行った。

c．ポリマー粒子の合成（EVAハイブリッド）

表(2)-9に示す組成に基づき，EDMA， DVB，MAA，4-vinylpyridine (4Vp)，多孔質化溶媒として，tolueneを用いてポリマー粒子を多段階膨潤重合法により合成した。また，スルホ基含有のポリマー粒子について，EDMAのみで合成した基材粒子をmethanol中に分散し，SSAをTBA錯体化状態で混合し，開始剤と共に70 ºCで反応させることで，粒子を得た。組成は，表(2)-10に示すとおりである。イオン性官能基を含むポリマー粒子のイオン交換容量は表(2)-11の通りとなった。なお，グラファイトカーボン粒子は，伊藤黒鉛工業株式会社，CNP7（固定炭素分（%）; 99.24，平均粒径; 7.9 μm）を用いた。

表(2)-9　合成したポリマー粒子の組成

略号	架橋剤	機能性モノマー
EDMA	EDMA	------
EDMA-MAA	EDMA（75 wt%）	MAA（25 wt%）
EDMA-4Vp	EDMA（75 wt%）	4Vp（25 wt%）
DVB	DVB	------

表(2)-10　スルホ基含有型ポリマーの組成

略号	基材	機能性モノマー
EDMA-SSA	EDMA粒子（13.0 g）	SSA-TBA（2.1 g）

表(2)-11　各ポリマー粒子のイオン交換容量（meq/g）

EDMA-MAA	EDMA-4Vp	EDMA-SSA
0.38	0.59	0.12

d. ハイブリッド体の合成

ハイブリッド体の基材となるスポンジモノリスは，他の課題報告と同じくEVAを用いた。ハイブリッド体の合成は，EVA，孔形剤（pentaerythritol），孔径助剤，および粒子を混合し，150 °Cで熱混練し，その後，130 °Cで外径4.8 mmとなるように射出成型した。また，得られたスポンジモノリスおよびハイブリッド体は，水超音波洗浄による孔形剤除去の後，methanolで超音波洗浄し，SEMを用いて，表面観察した。さらに，合成したハイブリッド体は，4.6 mm内径のHPLCカラムに充てんし，HPLCにより評価した。

６）距離認識を利用した伸縮性ヒドロゲルの開発とタンパク質の選択的吸着に関する研究

a. 試薬

用いた試薬および溶媒は，特に断らない限り，市販品をそのまま使用した。Poly(ethylene glycol) dimethacrylate (PEG-DMA)は新中村化学工業株式会社（Wakayama, Japan）から提供して頂き，そのまま使用した。

b. ヒドロゲルの合成

15 mLのpolypropylene tube（119 × 14.7 mm i.d.）に架橋剤，機能性モノマー，多孔質化溶媒，開始剤（架橋剤＋機能性モノマーの1.0 wt.%）を加え，室温で30分間かく拌した。かく拌後，polypropylene tubeをウォーターバスに浸漬し，50 °C, 24時間重合した。さらに，60 °Cで2時間後硬化した。後硬化後，PEG gelを脱型し，methanol，水で洗浄し，ディスク状に切断した。合成したPEG gelの物性として単位質量当りの吸水量を示す平衡膨張率（equilibrium swelling ratio）を算出した。算出式を（2.5）に示す。ここでW_wは水に浸漬した際のPEG gelの質量，W_dはPEG gelの乾燥質量を指す。

$$\text{平衡膨張率 } (g/g) = (W_w - W_d) / W_d \qquad (2.5)$$

c．各溶液に浸漬した際のヒドロゲルの膨潤・収縮挙動

PEG gelを水に浸漬し，体積が安定になるまで36 ºCで振とうした。体積安定したPEG gelを各溶液に浸漬し，36 ºCで体積が安定になるまで振とうした（乾燥ゲル40 mgに対して溶液10 mL）。体積安定後の断面積を測定し，相対膨張率（relative swelling ratio）を算出した。算出式を（2.6）に示す。ここでV_w (S_w) は水に浸漬した際の体積（面積），V_s (S_s) は各溶液に浸漬した際の体積（面積）を指す。

$$\text{相対膨張率} = V_s / V_w = (S_s / S_w)^{3/2} \qquad (2.6)$$

d．タンパク質インプリントゲルの合成

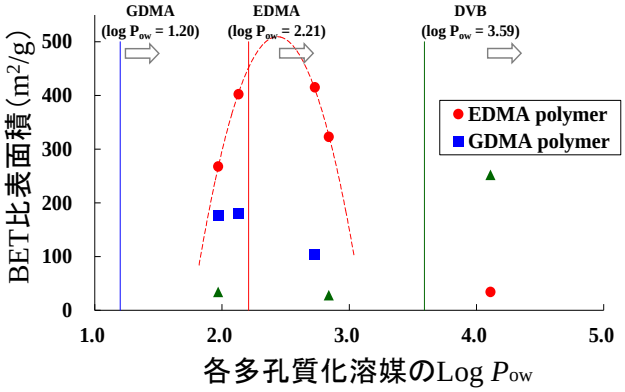
15 mLのpolypropylene tube（119 mm × 14.7 mm i.d.）に鋳型分子を加え，多孔質化溶媒に溶解した。次に，溶液に機能性モノマー，架橋剤，開始剤の順に加え，室温で30分間かく拌した。かく拌後，減圧脱気を行い，モノマー溶液をpyrex tube（60 mm × 9.0 mm i.d.）に移し，UVランプ（365 nm）で3時間重合した。重合後，protein imprinted gel（PI gel）を約1.0 mmに切断した。切断したPI gelをmethanolで2回洗浄し，1.0 M NaCl aq.で洗浄した。各洗浄液中のlysozyme量をUV-Vis（280 nm）で定量し，lysozymeが検出されなくなるまで，洗浄を繰り返した。洗浄後，一定濃度のタンパク質溶液に加え，室温で一定時間振とうし，上澄み溶液中のタンパク質をUVで定量した。各タンパク質の測定波長は以下の通りである。lysozyme, trypsin, avidin = 280 nm; cytochrome *c* = 409 nm.

４．結果及び考察

（１）難捕捉有機分子に対する疑似分子鋳型についての検討

１）揮発性有機化合物の選択的吸着に関する研究

a．吸着量に対する比表面積の効果



図(2)-21 BET比表面積とlog P_{ow}の相関関係

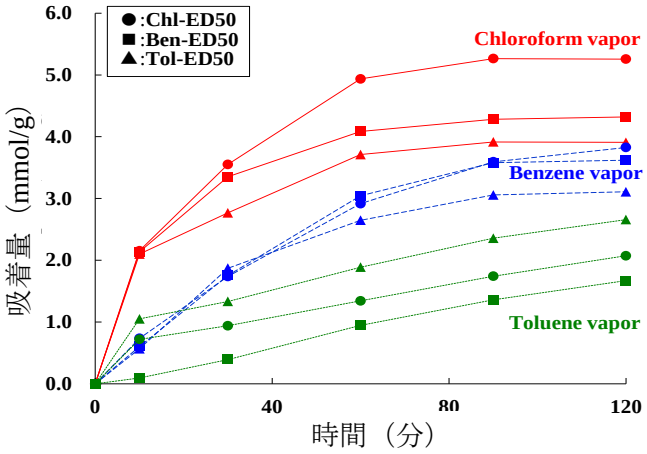
（多孔質化溶媒のlog P_{ow} value, chloroform, benzene, toluene, chlorobenzene, hexane = 1.97, 2.13, 2.73, 2.84, 4.11）

まず，架橋剤と多孔質化溶媒の違いによる比表面積の変化を観察した（図(2)-21）。この図は横軸に用いた試薬の log P_{ow}，縦軸に PIP の比表面積を示している。また，縦線は架橋剤の log P_{ow}

を示している。過去の研究から，架橋剤の log P_{ow} は重合が進むにつれて増加することが分かっている。図(2)-21 の結果から，多孔質化溶媒の log P_{ow} が架橋剤の log P_{ow} に近づくほど比表面積が増加した。特に EDMA を架橋剤とした場合，2.4 付近で極大値が存在することが示された。ここで，多孔質化溶媒として log P_{ow} の異なる 5 種類の分子を用いたが，比表面積の大きな架橋ポリマーを構築する場合，架橋剤と多孔質化溶媒の相関関係は重要な要因であることが示された。言い換えると，本検討で得られた結果から，架橋剤と多孔質化溶媒を変えることで，架橋ポリマーの比表面積を制御できることが示された。また，気相中での各分子に対する総吸着量は比表面積の違いによって変化すると考えられるため，比表面積の値を制御できることはこの点においても非常に有意である。

b. 溶媒インプリントによる分子認識性能

次に，気相中での各 VOC に対する選択的吸着能を評価した。本検討では，架橋剤比率を 50%，架橋剤として EDMA を用いた。まず，それぞれの VOC に対する溶媒インプリント効果を評価した。本検討では，飽和蒸気圧の高い chloroform, benzene, toluene の 3 種類の VOC を用いて評価を進めた。図(2)-22 に合成した PIP の各 VOC に対する吸着量を示す。この図は横軸に経過時間，縦軸に単位質量当りの吸着量を示している。また，線の違いは VOC の違いを示している（実線，chloroform; 破線，benzene; 点線，toluene）。図(2)-22 の結果から，chloroform に対しては Chl–ED50 で最も大きな吸着量が得られ，toluene に対しては Tol–ED50 で最も大きな吸着量が観察された。benzene を用いた場合でも，benzene に対する Ben–ED50 の吸着量はその他の VOC に比べて相対的に増加した。これらの結果から，合成した PIP は合成時に用いた多孔質化溶媒を気相中で選択的に吸着していることが示された。次に，飽和蒸気圧，比表面積の影響を無視するために数値解析した。表(2)-12 に各 VOC に対する PIP の吸着比を示す。例えば，toluene に対する Tol–ED50/Ben–ED50 の値がその他の VOC に対する Tol–ED50/Ben–ED50 の値よりも大きければ溶媒インプリント効果が発現していると考えられる。その結果，Ben–ED50/Chl–ED50 を除き，全ての点で溶媒インプリント効果が確認できた。以上の結果から，溶媒インプリント法が気体試料の選択的吸着に有効であることが示された。

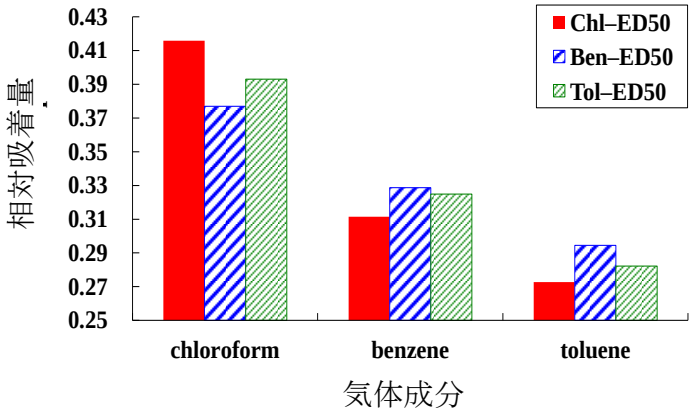


図(2)-22 各VOCに対する吸着量

表(2)-12　各 VOC に対する PIP の吸着比

		Vapors chloroform	benzene	toluene
Chl–ED50	/ Ben–ED50	1.14	1.09	1.26
	/ Tol–ED50	**1.25**	1.22	0.89
Ben–ED50	/ Chl–ED50	0.88	**0.92**	0.79
	/ Tol–ED50	1.10	**1.13**	0.71
Tol–ED50	/ Chl–ED50	0.80	0.82	**1.12**
	/ Ben–ED50	0.91	0.89	**1.42**

これまでの検討で，PIP は合成時に用いた多孔質化溶媒を選択的に吸着することが示された。そこで，気相中での混合分子（chloroform，benzene，toluene）に対する吸着性能を評価した。図(2)-23 に PIP の各 VOC に対する吸着率を示す。この図では各 PIP の総吸着量を 1.0 とし，各 VOC に対する吸着率を算出した。その結果, chloroform に対する吸着率は Chl–ED50 が最も高く, benzene, toluene に対する吸着率は Chl–ED50 が最も低かった。この結果からも，架橋ポリマーは構造認識により VOC を選択的に吸着していることが示された。以上の結果から，混合気相中においても溶媒インプリント効果が発現していることが確認できた。しかしながら，PIP 間での各 VOC に対する吸着量の違いはわずかであった。そのため，混合気相中での各 VOC に対する溶媒インプリントの効果ははっきり確認できたが，吸着量は飽和蒸気圧や比表面積に強く依存することが示唆された。そこで，ターゲット分子に対する選択性を増加させるために，従来の分子インプリント法と同様に，機能性モノマーを加えることで，Gas–MIP を合成した。

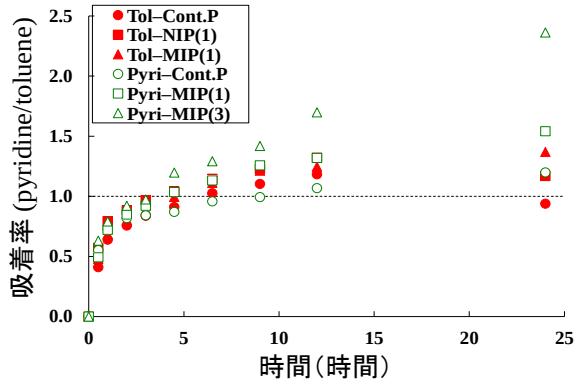


図(2)-23　混合VOCsに対する相対吸着率

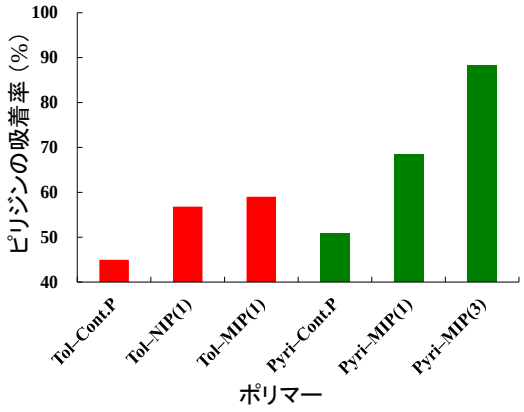
c．機能性モノマー，鋳型分子の効果による選択性の変化

本検討では，鋳型分子として pyridine，機能性モノマーとして MAA を用いて Gas–MIP を合成し，分子インプリントの効果を検討するために，pyridine と toluene の吸着量の比を比較した（図(2)-24）。その結果，MAA の導入量が増加するにつれて pyridine に対する吸着量が大きく増加した。この結果から，気相中においても，MAA と pyridine 間の水素結合が発現したと考えられる。また，Cont.P を比較した場合，溶媒インプリント効果により Pyri–Cont.P の pyridine に対する吸着量が増加した。さらに，全ての架橋ポリマーで，機能性モノマー，鋳型分子の効果により pyridine

に対する吸着量が増加し，分子インプリント法が気相中の分子にも有効であることが示された。最後に，混合気相中での分子に対する Gas–MIP の選択性を評価した（図(2)-25）。その結果，Tol–Cont.P では toluene に対する吸着量が大きく，Pyri–Cont.P では pyridine に対する吸着量が大きく溶媒インプリントの効果を確認できた。さらに，どちらの架橋ポリマーにおいても，機能性モノマー量が増加するにつれて pyridine に対する吸着量が増加し，鋳型分子を加えた場合も pyridine に対する吸着量が増加した。以上の結果から，溶媒インプリント法と機能性モノマーの化学的な相互作用を利用することで，気体試料の選択的吸着が可能であることが示された。



図(2)-24　各 Gas-MIP の吸着率 (pyridine/toluene)



図(2)-25　混合 VOC 中の pyridine に対する吸着率

２）スポンジモノリスの調製と保持特性

a. スポンジモノリスの基本保持特性評価結果

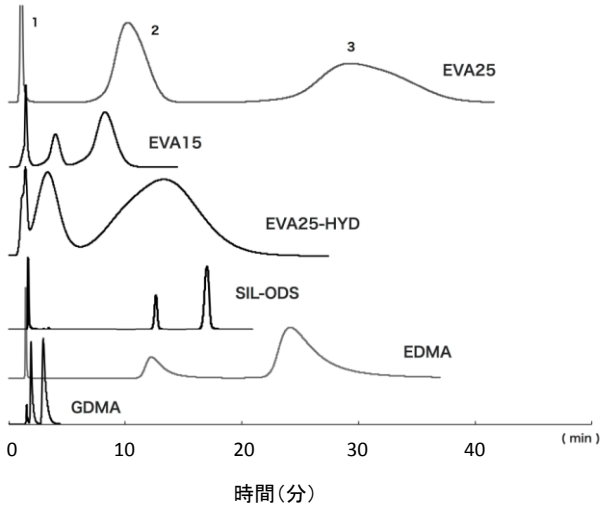
表(2)-13に各カラムの評価結果を示す。ここでpentylbenzeneの保持係数[k (C_5-Ph)]及びbutylbenzeneとpentylbenzeneの分離係数であるα(CH_2)は，固定相の疎水性の指標として用いられ，さらに同程度の疎水性を持ち，立体形状が異なる溶質であるtriphenyleneと*o*-terphenylの分離係数α(T/O)の値は，固定相の平面分子に対する選択性の指標として用いられている。表(2)-13の結果より，酢酸ビニル含量25%のスポンジモノリス（EVA25）は酢酸ビニル含量15%のスポンジモノリス（EVA15）よりも大きな疎水性保持能[k (C_5-Ph)]を示し，Silica-C_{18}カラムと同等の保持力を示した。

また，スポンジモノリスカラムは全体的に粒子系カラムよりも大きなα(T/O)値を示し，平面選択性が大きいことが判明した。さらに加水分解スポンジモノリス（EVA25-HYD）は全分離剤の中で最大のα(T/O)値を示し，平面形状の溶質を優先的に保持することが示された。EDMAポリマー粒子は，特に平面的な多環芳香族炭化水素を優先的に保持することが報告されているが[39]，スポンジモノリスはEDMAよりもさらに大きな平面選択性を示した。従って，この様な高い平面選択性はスポンジモノリスに特徴的な保持特性であると考えられる。

表(2)-13　各カラムのHPLC評価結果

	k (C_5-Ph)	α (CH_2)	α (T/O)	α (C/P)
EVA25	7.14	1.41	3.08	0.01
EVA25-HYD	2.19	1.41	6.23	0.04
EVA15	3.27	1.42	3.36	0.03
PE	4.93	1.43	2.27	0.74
EDMA	3.29	1.24	2.10	0.18
GDMA	0.19	1.13	3.03	0.44
Sil-C18	7.50	1.40	1.48	0.43

図(2)-26に各カラムの立体選択性を比較した代表的クロマトグラムを示す。EVA25とEVA15のクロマトグラムより，スポンジモノリス中の酢酸ビニル成分の増加は疎水性相互作用の増加をもたらす。またEVA25とEVA25-HYDの比較より，EVA25-HYDは加水分解により水酸基が導入されているにもかかわらず，EVA15よりも大きな疎水的保持を与えた。この結果はスポンジモノリスのポリマー表面に存在する水酸基がクロマトグラフィーにおける疎水的保持に大きな影響を与えないことを示唆している。加水分解後のスポンジモノリスは加水分解前よりも基材の柔軟性が減少することから，ポリマー表面の水酸基は水素結合により会合していると考えられる[40]。そのため，加水分解スポンジモノリスは水酸基が存在するにもかかわらず，固定相の親水性が弱められ，予想よりも大きな疎水的保持力を示したものと考えられる。またスポンジモノリスとEDMAカラムのピーク形状を比較すると，スポンジモノリスは分離効率の面ではEDMAに劣るが，ピークの対称性についてはテーリング傾向を示すEDMAよりも良好であった。ポリマー粒子分離剤は2 nm以下のミクロポアを含み，これが理論段数の低下やテーリングの要因となる。これに対し，スポンジモノリスは貫通孔以外の細孔が少ない構造から，粒子充てんカラムよりも移動相の浸透性が大きく，溶質の物質移動特性についても有利であるため，対称性の良いピーク形状を与えたと考えられる。

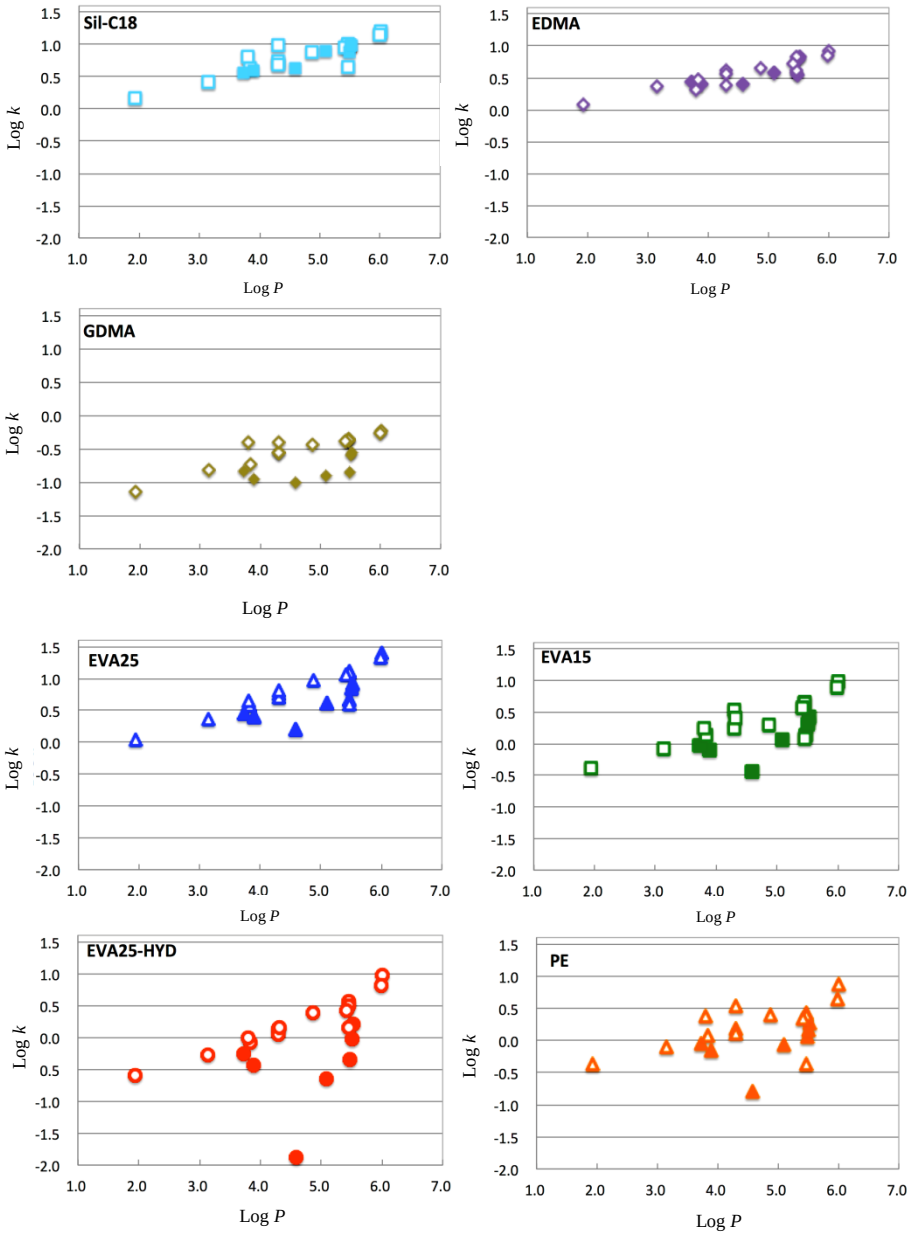


図(2)-26　スポンジモノリス及び粒子充てんカラムにおけるクロマトグラムの比較
Solutes : 1. uracil, 2. *o*-terphenyl, 3. triphenylene,
HPLC conditions
Column size, 100 mm × 4.6 mm i.d.; Flow rate, 1.0 mL/min; Mobile phase, methanol / water = 80/20 (v/v); Temperature, 40 °C; Detection, UV 254 nm

b. スポンジモノリスの平面選択性の確認

次にスポンジモノリスカラムにおける，溶質分子の疎水性と保持について検討した。分子の疎水性の指標として用いられるlog *P*値は1-オクタノールと水の間における分配係数から算出され，溶質のlog *P*値と逆相クロマトグラフィーにおける保持係数の対数値（log *k*）には相関があることが知られている。ここでは，立体構造に差のある疎水性試料を用い，スポンジモノリスにおける保持挙動を確認した。図(2)-27に各溶質の測定結果（log *k*）をlog *P*値に対してプロットした結果を示す。図中の白抜きのプロットは平面構造を持つ多環芳香族溶質群を示し，塗りつぶしのプロットは立体的にかさ高い溶質群を示している。図(2)-27の結果より，粒子充てんカラムでは溶質の疎水性に対応して保持が増加し，各溶質のプロットは右上がりの直線状に配列した。すなわち，粒子充てんカラムにおいては，溶質は主に疎水性相互作用により固定相に保持され，保持に対する溶質の立体形状の影響は少ないことを示している。

一方，スポンジモノリスは平面溶質群に対して粒子充てんカラムと同様の保持を与えるが，立体溶質群に対しては溶質の疎水性から予想される保持よりも小さな保持を与え，立体溶質群のプロットは平面溶質群のプロットよりも下方に大きく逸脱した。特に加水分解スポンジモノリスではこの傾向が大きく，立体的にかさ高い溶質の保持が小さい選択性を示した。スポンジモノリスにおける溶質の保持機構について，溶質の固定相表面に対する疎水的親和性が重要であると仮定すると，加水分解スポンジにおいて表面に存在する水酸基は立体的な疎水性分子の固定相への接近を阻害していると考えられる。これは水酸基を含むポリマー粒子分離剤であるGDMAのプロットが加水分解スポンジモノリスと同様の傾向を示すことから分離剤表面の水酸基は，かさ高い疎水分子の接近を妨げることが示唆される。したがって，スポンジモノリス固定相の表面状態の変化が平面選択性に大きな影響を与えていると推察される。



図(2)-27　各カラムにおける log *P* vs log *k* プロット

outlined plot ; plots for Planar PAHs, filled plot ; plots for sterically bulky PAHs.

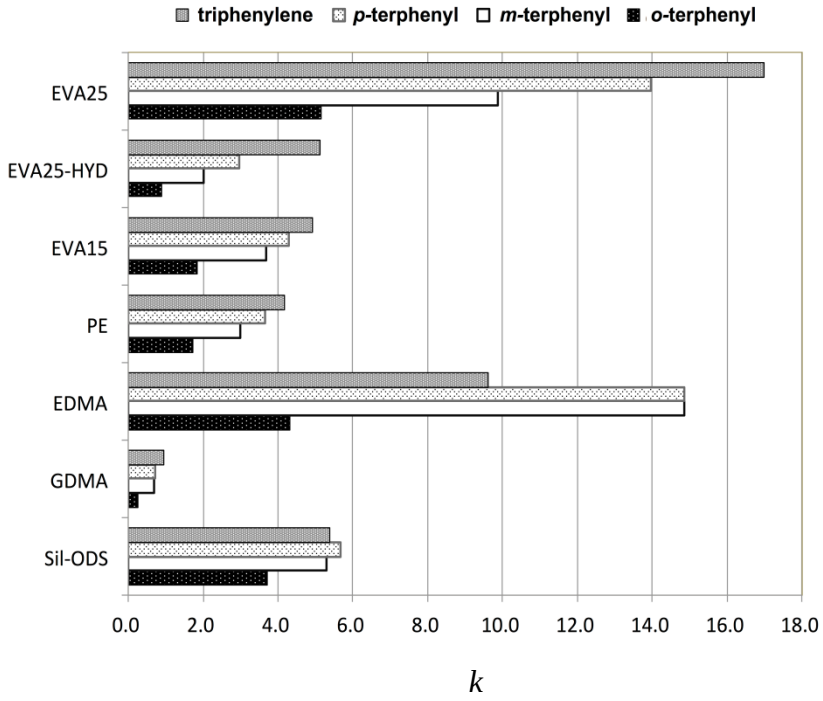
HPLC conditions

Column size, 100 mm × 4.6 mm i.d.; Flow rate, 1.0 mL/min; Mobile phase, acetonitrile/water = 70/30 (v/v); Temperature, 40 °C; Detection, UV 254 nm.

c. スポンジモノリスにおける溶質の保持機構

溶質の分子構造とスポンジモノリスにおける保持について，さらに検討を行った。図(2)-28に各カラムにおけるターフェニル異性体の保持を比較した結果を示す。検討を行った4種のスポンジモノリスにおいて，各ターフェニル異性体の溶出順序は全て*o*-, *m*-, *p*- の順となり，芳香環の回転によって一時的に平面性の高い配座構造を取ることができる*p*-異性体の保持が最大となった。他方，

粒子充てんカラムは*m*-及び*p*-異性体の分離が困難であった。さらにスポンジモノリスはターフェニル異性体よりも平面性の高いトリフェニレンを最も強く保持し，粒子系分離剤と異なる分離選択性を示した。この結果から，スポンジモノリスは，溶質分子の疎水性と固定相表面への接地性に依存した保持を与えるものと考えられる。

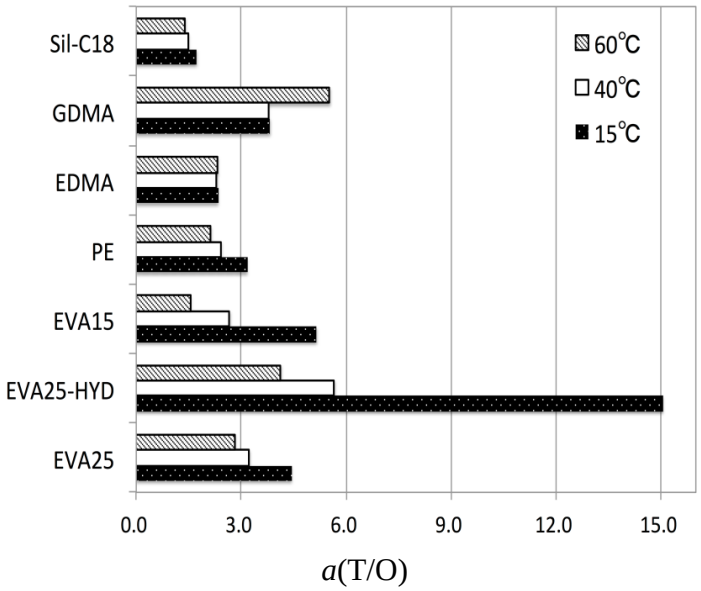


図(2)-28　ターフェニル異性体及びトリフェニレンの保持比較

HPLC conditions

Column size, 100 mm × 4.6 mm i.d.; Flow rate, 1.0 mL/min; Mobile phase, methanol/water = 85/15 (v/v); Temperature, 40 °C; Detection, UV 254 nm.

次に各カラムの立体選択性α(T/O)に対するカラム温度の効果を検討した結果を図(2)-29に示す。ここでsilica-C_{18}カラムの平面選択性は平面的な溶質が固定相アルキル基の隙間に深く侵入することでカラムに保持され，かさ高い分子は固定相内部への侵入が立体的に阻害されるために発現することが知られている。ここでカラム温度が上昇すると，固定相アルキル基は伸長・分散するため固定相アルキル基の密度が減少し，かさ高い分子も固定相内部に侵入可能となるため，結果的にα(T/O)値は減少する。スポンジモノリスにおいてもsilica-C_{18}と同様に，カラム温度の上昇と共にα(T/O)値の減少が認められた。しかし，スポンジモノリスはsilica-C_{18}カラムや他の粒子系分離剤よりも温度変化によるα(T/O)値の変化率が大きく，低温側で大きなα(T/O)値を示した。ここでも特に加水分解スポンジモノリスはカラム温度15 °Cの低温側において，極めて高い平面選択性を示した。



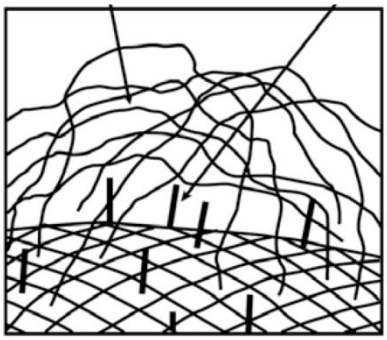
図(2)-29　立体選択性に対する温度効果

HPLC conditions

Column size, 100 mm × 4.6 mm i.d.; Flow rate, 1.0 mL/min; Mobile phase, methanol/water = 85/15 (v/v); Temperature, 40 °C; Detection, UV 254 nm.

ここで，ポリオレフィン系ポリマーであるEVAスポンジモノリスの基材上にはアルキル鎖由来の比較的柔軟なポリマー領域が存在していると推察され（図(2)-30），スポンジモノリスの疎水的保持能や平面選択性の発現には，この表面ポリマー鎖が関与しているものと考えられる。この表面ポリマー鎖はsilica-C_{18}カラムのアルキル基と同様に平面状疎水分子の保持に関与していると考えられる。さらにカルボニル結合を持つ固定相は芳香族化合物と特異的なカルボニル-π相互作用を示すため[41]，酢酸ビニル部分のカルボニル構造を持つEVAスポンジモノリスはPAHsに対して大きな保持を与えると考えられる。

また熱可塑性ポリマーであるEVAスポンジモノリスの物性は，酢酸ビニル含量や重合方法等の要素で変化する。スポンジモノリスの熱分析測定を行ったところ，酢酸ビニルを含まない，ポリエチレンホモポリマー基材から得られたスポンジモノリスは結晶性が高く，最も高い安定性を示した。一方スポンジモノリスの酢酸ビニルが増加すると，ポリマーの結晶性，融点及び剛直性は低下する。従って酢酸ビニル含量の大きいEVA25はポリマーの配向性が低く，スポンジモノリス表面上には，配向性の高いポリエチレンスポンジモノリスよりも多くの線状ポリマー鎖が存在すると考えられる。従ってEVA25は他のスポンジモノリスよりも高い疎水的保持能を持つものと考えられる。一方，加水分解スポン

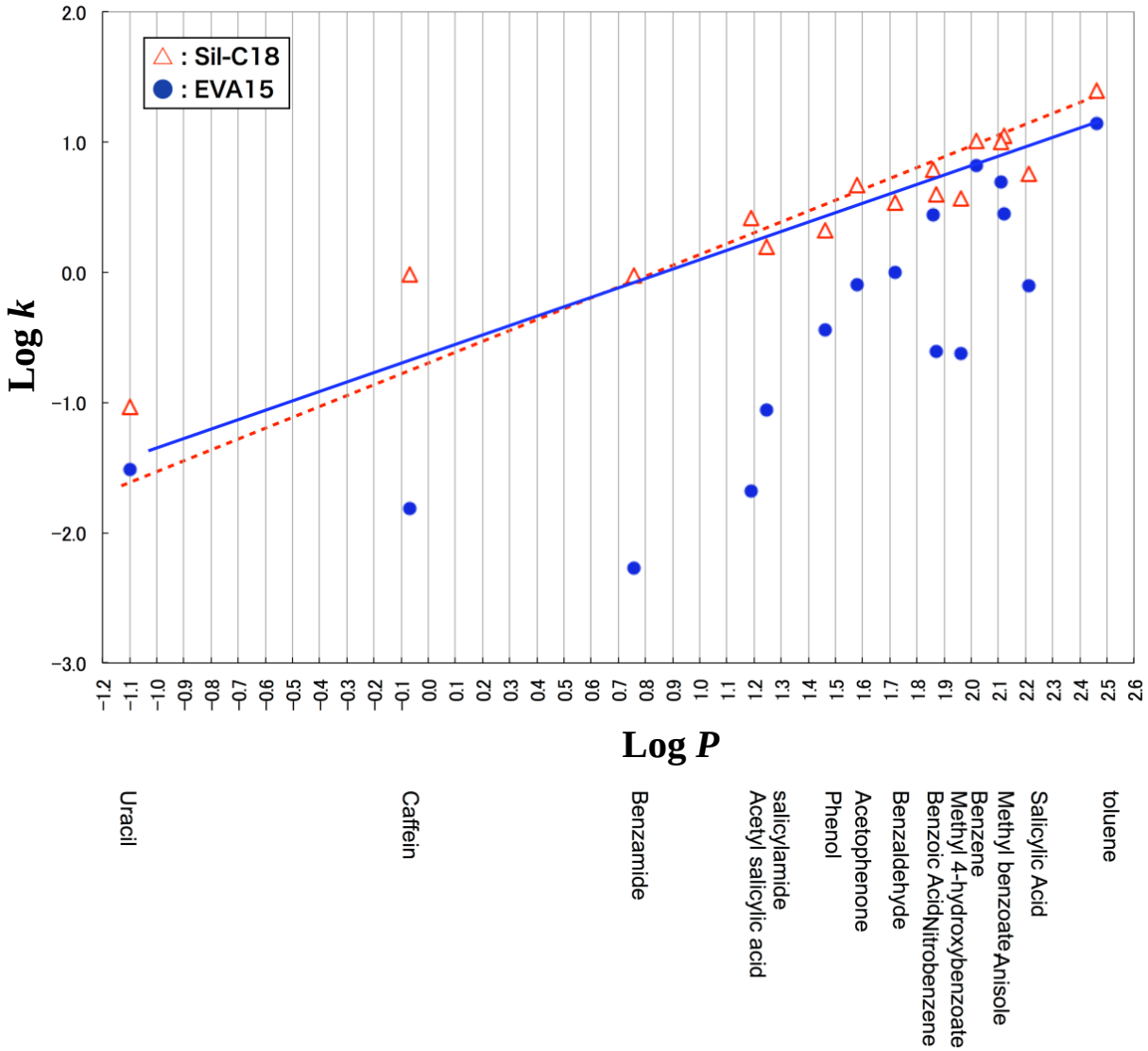


図(2)-30　EVAスポンジモノリス表面のポリマー構造イメージ

ジモノリスについては，露出した水酸基が相互に水素結合を生成した結果，表面の線状ポリマーは剛直に変化し，ポリマー鎖の間隔が加水分解前よりも狭くなることで高い平面選択性を発現したものと推察できた。温度効果の結果についても同様に，温度の低下によって基材の柔軟性が低下し，表面線状ポリマー鎖の間隔が減少した結果，低温で最大の平面選択性を発現したものと考えられる。

d. 高極性試料に対する保持挙動

bと同様の手法により高親水性化合物に対するスポンジモノリスの保持特性を評価した。図(2)-31にSilica-C_{18}カラム及びスポンジモノリスカラムで得られた各溶質のlog *k*と溶質のlog *P*プロットを示す。図中では疎水性相互作用の目安として, benzeneとtolueneのプロットを直線で示した。図(2)-31の結果より，Silica-C_{18}カラムは主に疎水性相互作用による保持が支配的であり，各溶質の保持はlog *P*値と共に増加した。一方，スポンジモノリスカラムは各溶質の疎水性とクロマトグラフィーにおける保持に顕著な相関は認められず，図(2)-31において分散したプロットを与えた。特にサリチル酸，メチルパラベン，安息香酸等のフェノール性水酸基やカルボキシル基を持つ溶質は，スポンジモノリスに対する相互作用が小さく，これらの溶質は図中の疎水性相互作用を示す直線の下側に分散したプロットを与えた。またスポンジモノリスの酢酸ビニルに由来するカルボニル基は，高極性の溶質に対して水素結合や極性−極性相互作用を行う可能性が期待されたが，実際には保持の増加には至らなかった。



図(2)-31　スポンジモノリスおよびsilica-C_{18}における極性試料の保持プロットの比較

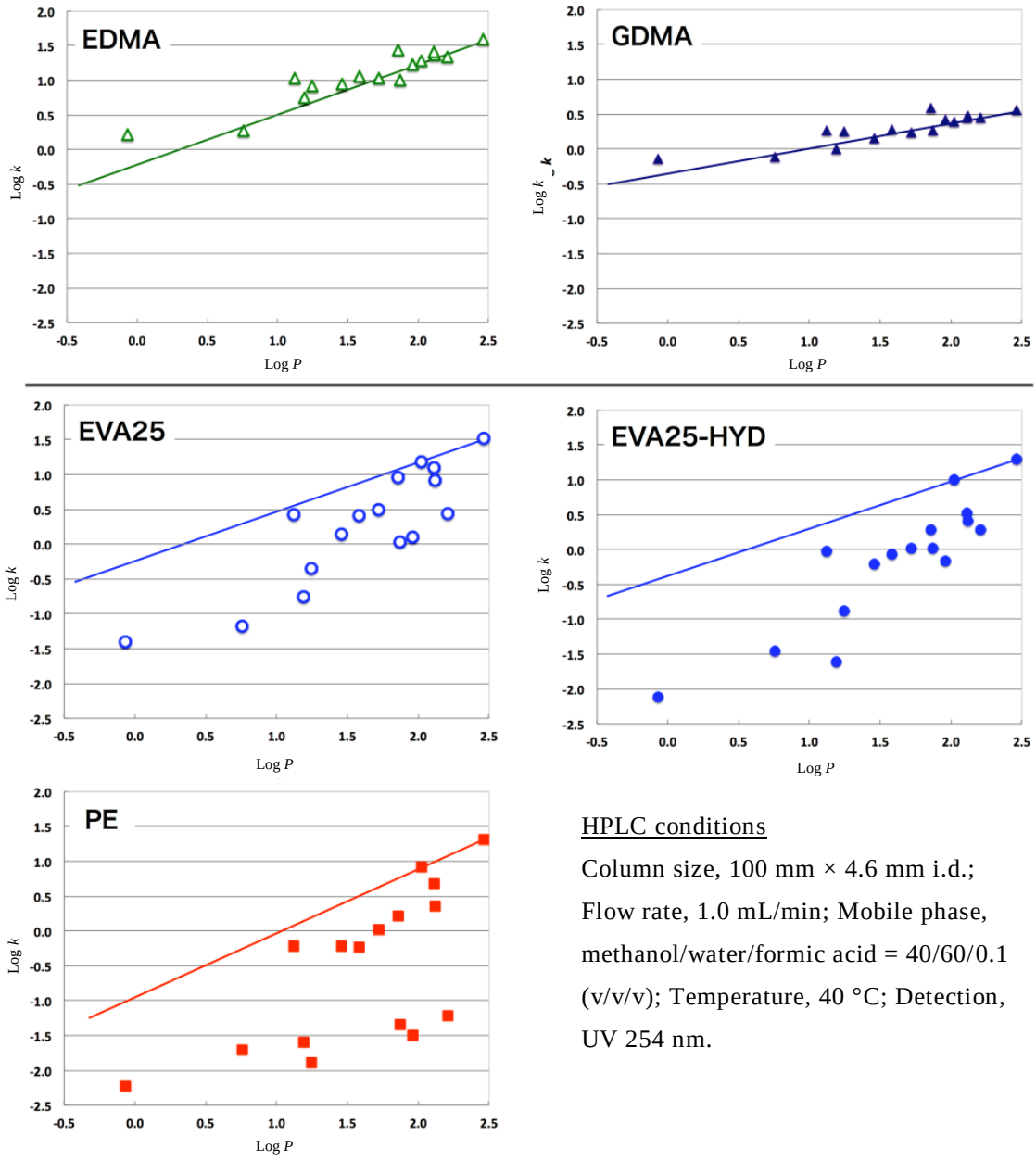
solute: 1. toluene, 2. salicylic acid, 3. methyl benzoate, 4. anisole, 5. benzene, 6. methyl 4-hydroxybenzoate, 7. benzoic acid, 8. nitrobenzene, 9. benzaldehyde, 10. acetophenone, 11. phenol, 12. salicylamide, 13. acetyl salicylic acid, 14. benzyl amine, 15. benzamide, 16. caffeine,

HPLC conditions

Column size, 100 mm × 4.6 mm i.d.; Flow rate, 1.0 mL/min; Mobile phase, methanol/water / formic acid = 40/60/0.1 (v/v/v); Temperature, 40 °C; Detection, UV 254 nm.

図(2)-32にその他のカラムにおける極性溶質の保持検討結果を示す。silica-C_{18}とEVA15の結果と同様に，粒子系分離剤であるEDMAとGDMAは溶質の疎水性に基づく保持を与え，各プロットは図中で直線上に配列した。これに対し，スポンジモノリスカラムにおける極性溶質のプロットは図(2)-31の結果と同様に，疎水性相互作用を示す直線より下側に分散した。図(2)-31及び図(2)-32の結果は，高極性試料に対する保持が大きいとされているポリマー系分離剤の保持特性とは大きく異

なり，スポンジモノリスに特有の保持特性であると考えられる。よってスポンジモノリスカラムは他のポリマー分離剤において極性溶質の保持を増加させる親水性相互作用や水素結合等，二次的な保持効果を殆ど示さない分離剤であると考えられた。高極性の溶質は何らかの要因により，スポンジモノリスへの相互作用が阻害されていることが示唆される。



図(2)-32　極性試料の保持プロットの比較

e．一置換benzene化合物の極性官能基による保持効果

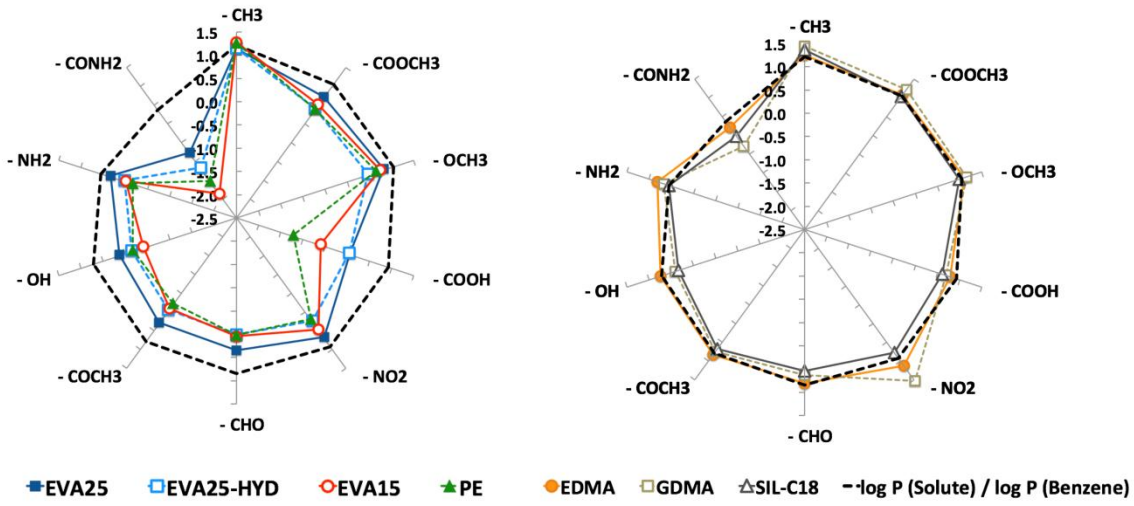
さらにスポンジモノリスにおける極性官能基の保持効果を評価するため，一置換benzene化合物の官能基が保持に与える効果を検討した。表(2)-14にbenzeneのlog *P*値に対する各溶質のlog *P*値比（$\log P_{Solute} / \log P_{Benzene}$）を%で示し，さらに図(2)-33に各カラムで得られた実測保持係数の対数

値比（log k_{Solute} / log $k_{Benzene}$）と共にレーダーチャートとして示す。このレーダーチャートは溶質である一置換benzeneの官能基の種類により，各溶質の保持が疎水性から予測される値とどの程度乖離しているかの情報を与える。図(2)-33bに粒子充てんカラムの測定結果を示す。各カラムで得られた実測保持係数の対数値比（log k_{Solute} / log $k_{Benzene}$）は点線で示す各溶質のlog *P*値比の計算値（log P_{Solute} / log $P_{Benzene}$）と良く一致した。この結果は，先の結果同様に粒子充てんカラムにおける極性化合物の保持が分子全体の疎水性の大きさに依存することを示している。これに対し，スポンジモノリスにおける極性化合物の保持図(2)-33aは各溶質のlog *P*値比から予測される保持よりも小さな値を示し，レーダーチャートにおいて内向きのプロットを示した。ここで，bに示した疎水性化合物の保持挙動の結果より，スポンジモノリスは平面形状の溶質を保持する特性を持つことが判明したが，極性化合物の場合においても，スポンジモノリスは同様の保持特性を示すと考えられる。すなわち極性化合物は移動相中で水和されることで分子の平面性が損なわれ，スポンジモノリス固定相表面への接近が不利になるものと推察される。これよりスポンジモノリスは平面状の疎水性溶質を選択的に保持するが，高極性及び立体的な溶質の保持が特徴的に小さい選択性を示す分離媒体であると考えられる。

表(2)-14　benzeneのlog *P*値に対する各溶質のlog *P*値比

Solute	-R	log *P*	log P_{Solute} /log $P_{Benzene}$
Toluene	$-CH_3$	2.46	122 %
Methyl benzoate	$-COCH_3$	2.12	105 %
Anisole	$-OCH_3$	2.11	104 %
Benzene	-----	2.02	100 %
Benzoic Acid	-COOH	1.87	93 %
Nitrobenzene	$-NO_2$	1.86	92 %
Benzaldehyde	-CHO	1.72	85 %
Acetophenone	$-COCH_3$	1.58	78 %
Phenol	-OH	1.46	72 %
Benzyl amine	$-NH_2$	1.12	55 %
Benzamide	$-CONH_2$	0.76	37 %

a) スポンジモノリス　　b) 粒子充てんカラム



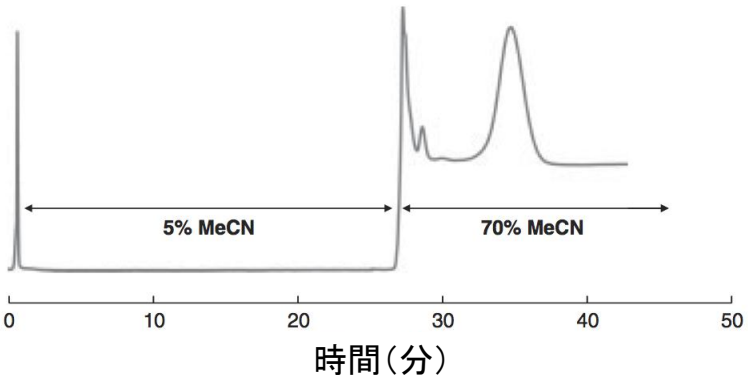
図(2)-33　benzeneの保持に対する各溶質の実測保持比

HPLC conditions

Column size, 100 mm × 4.6 mm i.d.; Flow rate, 1.0 mL/min; Mobile phase, methanol/water/formic acid = 40/60/0.1 (v/v/v); Temperature, 40 °C; Detection, UV 254 nm.

f. スポンジモノリスの実試料への応用

これまでの検討により，スポンジモノリスは既存の分離剤に無い極めて大きな平面選択性を示すことから，環境分析において平面性の高いターゲット分子に対して有用な分離剤になるものと考えられる。例えば，PAHであるbenzo[a]pyrene（BaP）はこれまでの研究において，発がん性（発がん性の誘発）物質として認識されており，主に土壌，大気に広く分布する環境汚染物質である。図(2)-34にスポンジモノリスカラムをカラムスイッチングにおける濃縮カラムとして想定し，BaPをモデル濃縮試料として評価を行ったクロマトグラムを示す。ここでは50 mlの試料水を前処理カラム通液した場合を想定し，グラジェント溶出の初期溶媒を流速2.0 mL/minで25分間送液した後に移動相の溶出強度を上げ，カラムに保持されたBaPを溶出させた。図(2)-34に示すクロマトグラムより，BaPはスポンジモノリスに濃縮され，移動相の溶出強度を増加させることでカラム内から回収された。予想通り，スポンジモノリスカラムは多量の試料水が通液可能な分離剤であり，その平面選択性を利用して，環境水中のBaPの濃縮用途に適用可能であることが判明した。

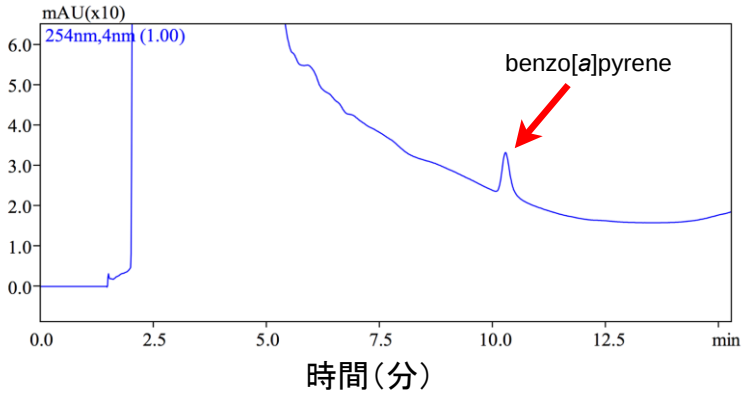


図(2)-34　スポンジモノリスカラムによるベンツ[a]ピレンの濃縮

HPLC conditions

Column size, 100 mm × 4.6 mm i.d.; Flow rate, 2.0 mL/min; Mobile phase, acetonitrile/water = 5:95 v/v (0–25 min), 70:30 (25-40 min); Temperature, 40 °C; Detection, UV 254 nm.; solutes, benzo[*a*]pyrene, 5.0 mL (100 ppm).

次に竹酢液中の微量BaPの濃縮を試みた。竹酢液とは竹（炭）を高温で処理する際に得られる生成物で，90%程度の水成分を含む溶液中には，多種の有機酸，ポリフェノール，アルコール類を含んでおり，抗菌作用があるとされ純度の高いものから低いものまで市販されている。しかしながら，純度の低い竹酢液では，製造過程で生じるタール成分中のBaPを含む多環芳香族の残存が示唆されている。このため簡易手法による精製により，竹酢液中のBaPを除去することが要求されている。図(2)-35はBaPを約10 μg/Lの濃度で含む竹酢液の10倍希釈液30 mLを，スポンジモノリスカラムを前処理カラムとするカラムスイッチングシステムで測定したクロマトグラムである。竹酢液は多種の夾雑物を含む試料であるにもかかわらず，スポンジモノリスカラムは竹酢液中のBaPを選択的に濃縮し，前処理カラムとして適用可能であることが示された。

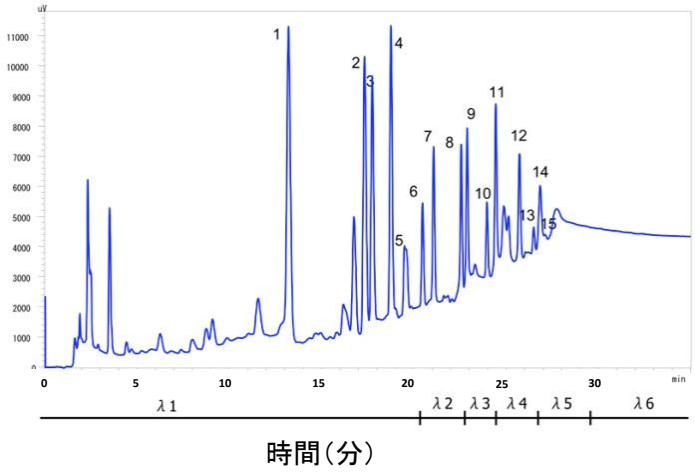


図(2)-35　スポンジモノリスによる竹酢液中benzo[a]pyreneの濃縮

HPLC conditions

Column, ODS (100 mm × 4.6 mm i.d.); Pretreatment column, EVA spongy monolith (50 mm × 4.6 mm i.d.); Flow rate, 1.0 mL/min; Mobile phase, 80% acetonitrile; Temperature, 40 °C; Detection, UV 254 nm.; Concentrate flow rate, 2.5 mL/min; Concentrate time, 12 min; Sample, 10 fold diluted chikusaku-eki aqueous sample (bamboo pyroligneous acid)

さらに，同スポンジモノリスカラムスイッチングシステムにより，PAHsを測定した結果を図(2)-36に示す。このクロマトグラムは10-100 ng/L濃度でPAHsを実際の河川水に添加した擬似試料10 mLをスポンジモノリスカラムに通液し，濃縮後，蛍光検出器で測定を行ったものであるが，スポンジモノリスを前処理カラムとするカラムスイッチングシステムにより，河川水中の15種PAHsが十分測定可能であることが明らかとなった。



図(2)-36　スポンジモノリスカラムスィッチングシステムによる河川試料中PAHsの濃縮

1. naphthalene, 2. acenaphthene, 3. fluorene, 4. phenanthrene, 5. anthracene, 6. fluoranthene, 7. pyrene, 8. benzo[a]anthracene, 9. chrysene, 10. benzo[b] fluoranthene, 11. benzo[k] fluoranthene, 12. benzo[a]pyrene 13. dibenz[a,h]anthracene, 14. benzo[g,h,l]perylene, 15. indeno[1,2,3-cd]pyrene.

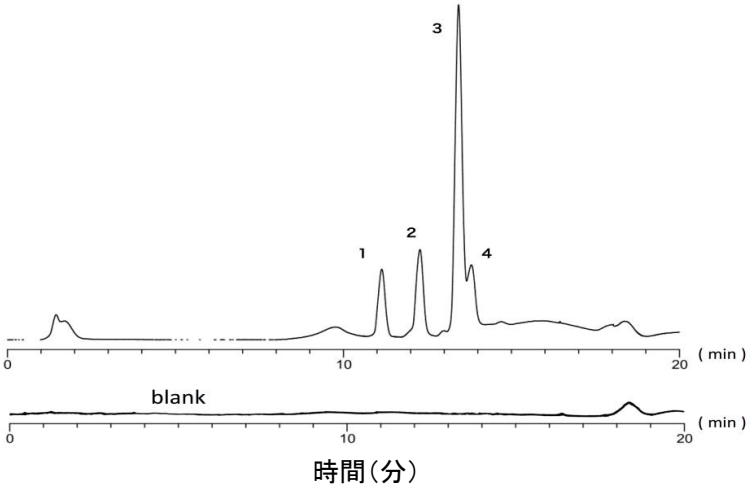
HPLC condition

Pretreatment column, EVA spongy monolith (50 mm × 4.6 mm i.d.); Temperature, 40 ^{o}C; Detection, fluorescence wavelength switching as follows, initial: Ex/Em 270/330 nm, 17.5 min: 250/370 nm, 19.5 min: 330/430 nm, 21 min: 270/390 nm, 23 min: 290/430 nm, 25.5 min: 370/460 nm, 28 min: 270/330 nm; Mobile phase, water/acetonitrile gradient elution, gradient profile; initial: 4/6 (v/v), 14 min: 6/4, 22 min: 0/10, 36 min: 0/10, flow rate (analytical); 1.5 mL/min, (pretreatment); 1.0 mL/min; Sample, PAHs spiked Kamo-river water in Kyoto; Injection volume, 10.0 μL; Sample concentration, No. 2,3,4,7,8,12,13,14,15 ; 10 ng/L,　No. 5,6,9,10,11 ; 20 ng/L, No. 1,13 ; 100 ng/L; Column: Restek Pinacle Ⅱ PAH (250 mm ×4.6 mm i.d.)

g. 生体試料分離に対するスポンジモノリスの適用

これまでの結果より，スポンジモノリスは極性物質に対する保持が小さい分離剤であることが判明した。環境分野における極性物質の分離にスポンジモノリスを利用するには，表面修飾による新たな官能基の導入や極性物質に対する選択性の付与が必要になると思われる。しかし，極性溶質の保持が小さいスポンジモノリスの保持特性は，高極性の夾雑物を含む生体試料の分離に対して有用であると考え，スポンジモノリスの逆相モードにおけるタンパク試料の分離を試みた。図(2)-37はスポンジモノリスによるタンパク試料の分離の例であるが，極めて低いカラム圧で対称性の良いピークが得られた。生体試料の分離においては，夾雑物や分析対象物が分離剤に不可逆的に吸着し，カラムの目詰まり，回収率の低下，ピーク形状の不良や保持時間変動の要因となる。

また，silica-C_{18}分離剤においては，カラム内に残存したタンパク試料がブランク試料測定時にキャリーオーバーとして溶出することがある。図(2)-37下段のクロマトグラムはスポンジモノリスカラムでタンパク試料を10回程度測定後，ブランク試料を測定したものであるが，各タンパクの溶出位置にピークは認められず，カラム内に先に注入したタンパク試料が残存しないことが確認できた。スポンジモノリスはポリマー素材のため，シリカ系分離剤でしばしば問題となるタンパク試料の吸着による分離効率や回収率の低下が少なく，巨大分子の物質移動に適する大きな貫通孔を持つため，生体試料の分離用途としても優れた分離剤であると考えられる。



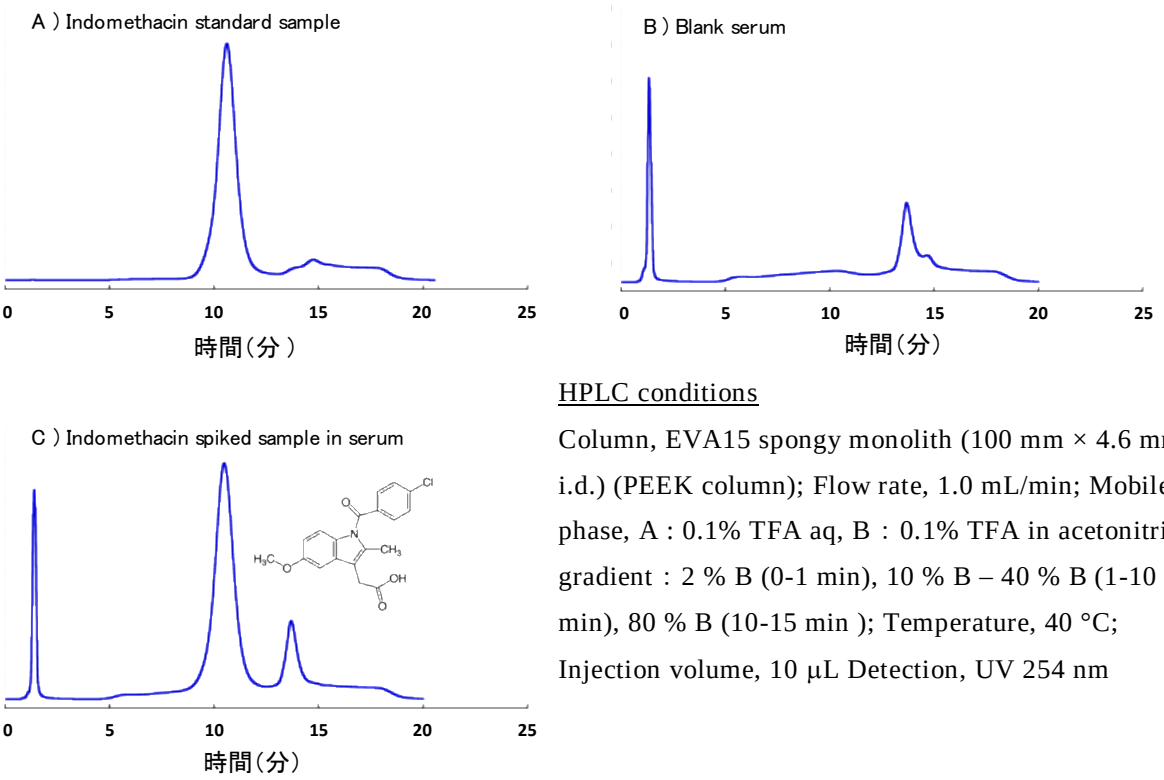
図(2)-37　スポンジモノリスによるタンパク試料の分離

1. ribonuclease A, 2. cytochrome C, 3. chymotrypsinogen, 4. conalbumin.

HPLC conditions

Column, spongy monolith column (100 mm × 4.6 mm i.d.); Flow rate, 1.0 mL/min; Mobile phase, A : 0.1% TFA aq, B : 0.1% TFA in acetonitrile, Gradient: 5-60 %B for 10 min; Temperature, 40 °C; Detection, UV 280 nm

次にスポンジモノリスの分離特性を利用した応用として，多量のタンパクを夾雑成分とするマトリックスから目的成分を抽出する用途について検討を行った。ヒト血清に抗炎症薬であるインドメタシンをモデル化合物として添加した試料を調製し，前処理なしで直接カラムに注入したクロマトグラムを図(2)-38に示す。一般に血清試料の様にタンパクを多量に含む試料を前処理なしでカラムに直接注入すると，試料中のタンパク成分が変性し，不溶化することでカラム圧力が上昇するため，生体試料のHPLC分析には除タンパク等の前処理が必須である。しかし分離剤としてスポンジモノリスを用いる場合，夾雑成分である親水性のタンパクは排除され，カラムデッドボリューム付近に溶出されると同時に目的成分であるインドメタシンを夾雑ピークに影響されない保持時間に溶出させることが可能であった。さらに繰り返しの血清試料の注入を行った場合でも，スポンジモノリスカラムにおける測定中のカラム圧力の上昇やインドメタシンの溶出時間の変化は認められなかった。この分離例は疎水性の溶質を保持し，夾雑タンパクの溶出特性に優れたスポンジモノリスの分離特性を生かした応用例と考えられる。この様なスポンジモノリスの分離特性は，環境分野のみならず，生体試料分析における迅速かつ実用的な分離手法をもたらすものと期待される。



HPLC conditions

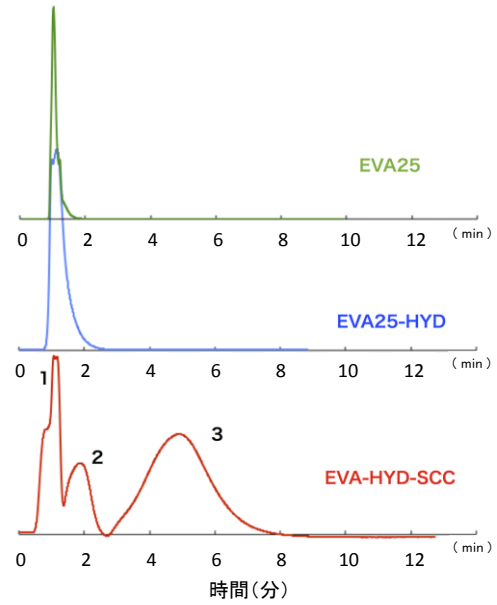
Column, EVA15 spongy monolith (100 mm × 4.6 mm i.d.) (PEEK column); Flow rate, 1.0 mL/min; Mobile phase, A : 0.1% TFA aq, B : 0.1% TFA in acetonitrile, gradient : 2 % B (0-1 min), 10 % B – 40 % B (1-10 min), 80 % B (10-15 min); Temperature, 40 °C; Injection volume, 10 μL Detection, UV 254 nm

図(2)-38　スポンジモノリスカラムへの血清試料の直接注入

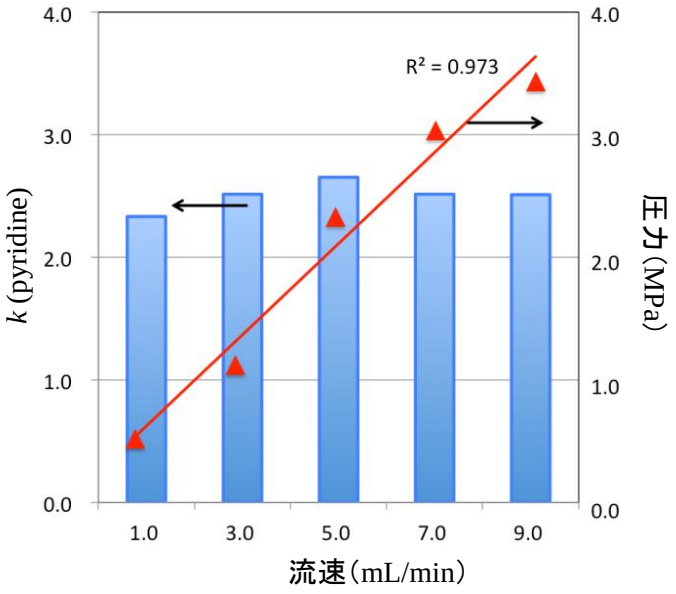
h. イオン交換基修飾スポンジモノリスによる高速分離

スポンジモノリスの化学修飾について，加水分解後のスポンジモノリスはFT-IRスペクトルの1237 cm^{-1}，1736 cm^{-1}のエステル由来の吸収が消失していることから，加水分解を定性的に確認した。また酸クロライドにより表面修飾を行ったスポンジモノリスについては，反応後に再度エステル結合由来の吸収が認められることで表面修飾の成否を確認し，酸クロライドの反応率は反応後の重量変化から算出した。図(2)-39にコハク酸クロライドにより表面修飾を行ったスポンジモノリスカラム（EVA25-HYD-SCC）による塩基性溶質のイオン交換分離例を示す。塩基性溶質のシチジン及びpyridineは未修飾スポンジモノリス（EVA25）やその加水分解スポンジモノリスカラム（EVA25 –HYD）では保持されないが，EVA25-HYD-SCCカラムはこれらの溶質に対する保持を与え，イオン交換型分離剤として機能した。

次にイオン交換基導入後の分離剤の通液性を評価した。図(2)-40にEVA25-HYD-SCCカラムにおける移動相流速とpyridineの保持係数及びカラム圧力の関係を示す。スポンジモノリスカラムは移動相流速を増加させても，安定した塩基性溶質の保持を示した。またEVA25-HYD-SCCカラムは，毎分9.0 mLの高流量で送液を行った場合でも，約3.5 MPa 以下の低圧力で送液が可能であり，高機能かつ高選択性のハイスループット分離剤であることが確認された。これはスポンジモノリスカラムのイオン交換モードにおける高速分離の初の実施例である。



図(2)-39　化学修飾スポンジモノリスによる塩基性溶質のイオン交換分離
solutes : 1. uridine, 2. cytidine, 3. pyridine,
HPLC conditions
Flow rate, 1.0 mL/min; Mobile phase, methanol/water = 5/95 (v/v); Temperature, 40 °C; Detection, UV 254 nm.

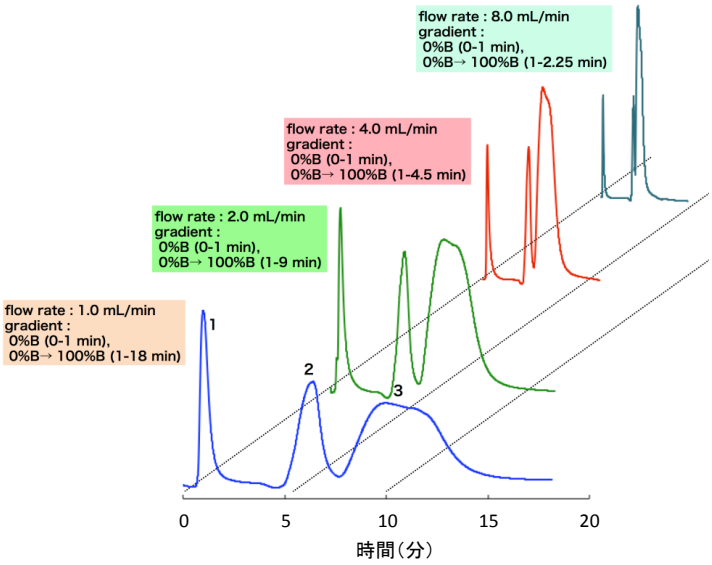


図(2)-40　EVA25-HYD-SCCカラムにおける移動相流速とpyridineの保持係数及びカラム圧力の関係
HPLC conditions
Column size, 100 mm × 4.6 mm i.d.; Flow rate, 1.0 mL/min; Mobile phase, methanol/water = 5/95 (v/v); Temperature, 40 °C; Detection, UV 254 nm

i. ジエチルアミノ化スポンジモノリスカラムによるタンパク試料の分離

アクリル酸クロライドを反応後，マイケル付加反応によりジエチルアミノ化したスポンジモノリス（EVA25-HYD-AC-DEA）について評価を行った。反応後の重量変化より，スポンジモノリスの反応率は表面水酸基に対して約16%となり，スポンジモノリス基材1.0 gに対して0.7 mmolのイオン交換基が存在すると計算される。スポンジモノリスの表面積は既存の粒子分離剤よりも小さいが，このイオン交換基導入量は市販のポリマー系粒子分離剤に匹敵すると考えられる。

図(2)-41にEVA25-HYD-AC-DEAカラムによりタンパク質試料を分離したクロマトグラムを示す。塩基性のタンパク質試料はアニオン交換モードでEVA25-HYD-AC-DEAカラムに保持されており，移動相の塩濃度を変化させるグラジェント溶出法により各タンパク試料が分離され，流速8.0 mL/minの条件下でも高速分離が可能であたった。これより，加水分解スポンジモノリスをアクリル酸クロライドで修飾し，その後マイケル付加反応を用いてジエチルアミンを導入する手法は，スポンジモノリスにイオン交換基を導入する方法として有効であることを確認した。先の検討で，未修飾スポンジモノリスは逆相モードにおいてタンパク試料を分離可能であったが，図(2)-41の結果は初の高通水性イオン交換分離剤によるタンパク試料の分離例である。イオン交換基を導入したスポンジモノリスは環境や生体試料の分離において，選択性の高い分離剤であり，今後の応用が期待される。



図(2)-41　EVA25-HYD-AC-DEAカラムによるタンパク試料の高速イオン交換分離

HPLC condition

Column, EVA25-HYD-AC-DEA (50 mm × 4.6 mm i.d.); Flow rate, 2.0 mL/min; Mobile phase, (A) 5.0 mM tris-HCl, pH 9.0, (B) 5.0 mM tris-HCl, pH 9.0 + 0.5 M NaCl; Temperature, 40 °C; Detection, UV 220 nm; Solute, 1. ovalbumin, 2. ribonuclease A, 3. Lysozyme.

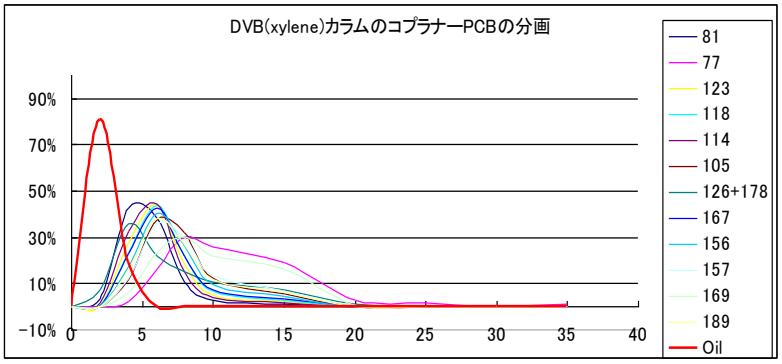
３）PCBの選択的分離を目的としたスルホキシド含有型分子インプリント固相剤の開発

～油中PCBの捕捉について～

a. 4種類の条件により合成した固相とDVBポリマーのみの固相の5種類について分画試験データをとり，検証を行った。

・DVB基材ポリマーによる固相（スルホキシドの付加はなし）

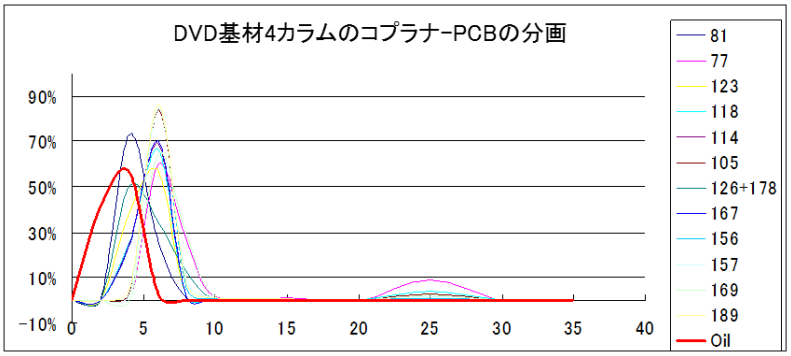
DVB基材ポリマーのみでも絶縁油とはある程度の分離が確認できた（図(2)-42）。基材の選択も大きな要因となることが確認できた。



図(2)-42　DVB（xylene）カラムのコプラナーPBCの分画

・DVB基材ポリマーの固相（スルホキシドが4倍量で合成した）

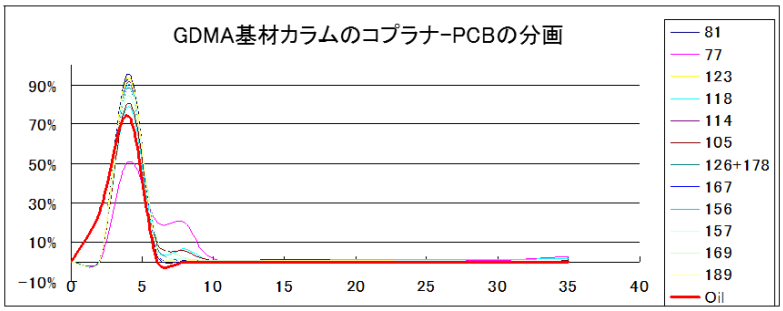
スルホキシドの量を増やしても絶縁油とPCBの分離能力の変化はなく，相関関係はあまり観られなかった（図(2)-43）。分離についてはスルホキシドと必ずしも比例するわけでない結果が得られた。



図(2)-43　DVB基材4カラムのコプラナーPBCの分画

・GDMA-CMS基材ポリマーの固相

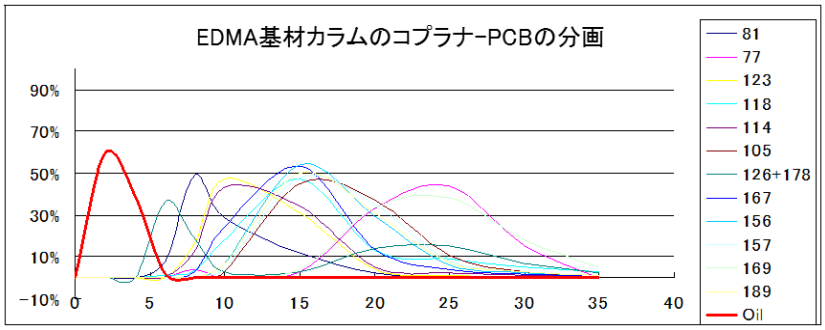
GDMA基材は保持があまりなく早い時間帯で溶出した（図(2)-44）。これは，GDMA基材が親水性のため，基材での保持がないものと推察される。



図(2)-44　GDMA基材カラムのコプラナーPBCの分画

・EDMA-CMS基材ポリマーの固相

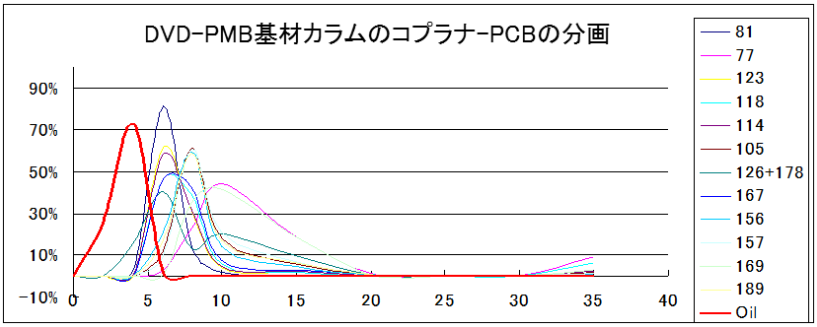
EDMA基材は溶出パターンが従来とは異なるパターンで溶出した（図(2)-45）。EDMAはインプリント効果が出やすいためによる。また，EDMAは平面認識が良好であるが，絶縁油（今回は鉱油，直鎖脂肪族）と芳香族環を持つPCBとの間で保持が働いた考えられる



図(2)-45　EDMA基材カラムのコプラナーPBCの分画

・DVB-PMBによる基材ポリマーの固相

PMBについては，キシレンとほぼ同程度の効果であった（図(2)-46）。これまでの研究で，tetrahydrofuranやacetonitrileでは，インプリント効果が低いことを確認している。PMBでもキシレンと同等のインプリント効果が起きていると予想される。

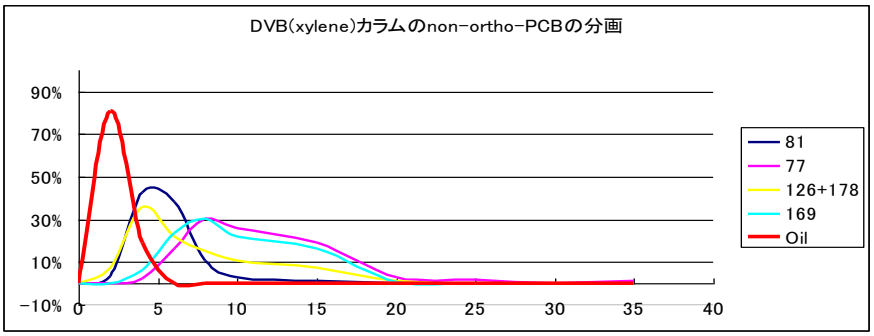


図(2)-46　DVB-PMB基材カラムのコプラナーPBCの分画

次に，このキシレン（*o*-,*m*-,*p*-3異性体混合品）を分子鋳型としたインプリント効果を確認するために，生体に対して毒性が高いコプラナーPCBのうち，2または3個の塩素イオンを持つ構造である

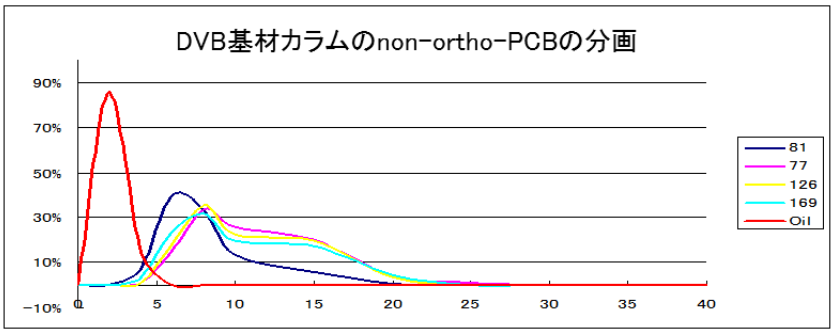
異性体である，#81(4,3’,4’,5’-) ，#126(3,4,3’,4’,5’-)と#169(3,4,5,3’,4’,5’-)とを選択し比較した。また併せて，左右対称に塩素が付加している#77(3,4,3’,4’-)についての比較を行った。これは，擬似分子鋳型として使用したキシレンの3種類の異性体のメチル基の配置とPCBのうち2または3個の塩素イオンを持つ構造が鋳型として効果があるのではないかと考えた。上記のデータのうち，この4個のPCB異性体のみで比較した。

スルホキシドを導入していないポリマーでも，擬似分子鋳型としたキシレンの効果が表れたため，#77,#169の異性体（2つのbenzene環に左右対称に塩素が付加している構造）について溶出時間遅くなり保持効果が出現していると考えられる（図(2)-47）。

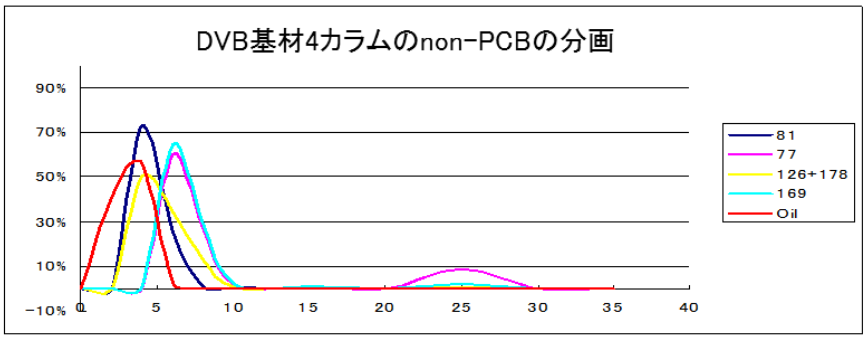


図(2)-47　DVB（xylene）カラムのnon-ortho-PBCの分画

スルホキシドの導入効果について見てみると異性体により更に保持が強く溶出時間が遅い傾向が確認された（図(2)-48）。また，#77,#169は保持効果が更に強いことが確認された。その一方，4倍量のスルホキシドを導入して合成した場合は，保持効果の傾向は同等であり，溶出時間のバンドが狭くシャープになった（図(2)-49）。考えられることとして，スルホキシド導入量の増加に従い，保持容量が大きくなったためではないかと考えられる。

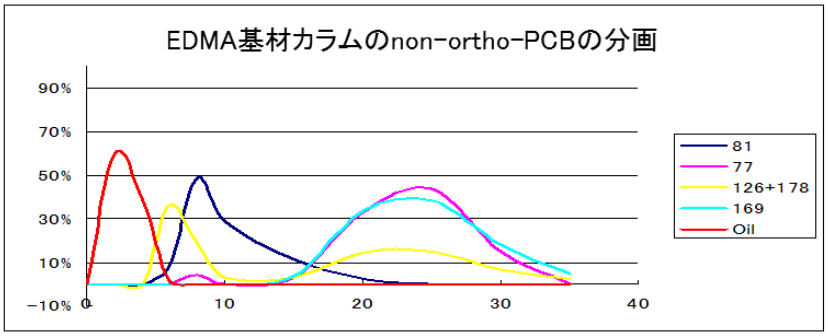


図(2)-48　DVB基材カラムのnon-ortho-PBCの分画



図(2)-49　DVB基材4カラムのnon-ortho-PBCの分画

EDMAを基材としたポリマーでは傾向は更に強く表れている（図(2)-50）。前述したように，EDMAそのものの平面認識力とキシレンの擬似分子鋳型によるインプリント効果が二重に合わさり，他のポリマーでは見られなかった効果が現れたと考えられる。

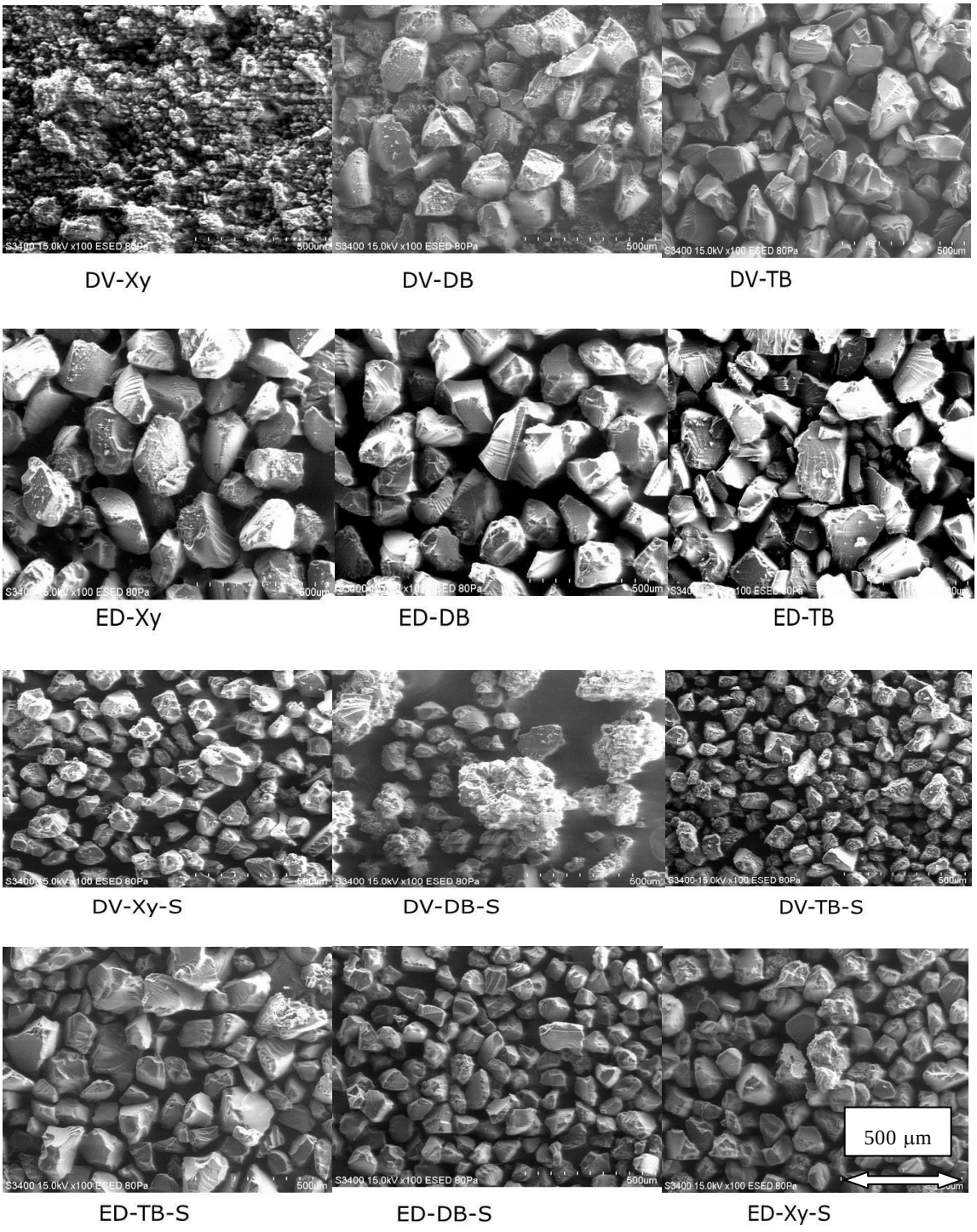


図(2)-50　EDMA基材カラムのnon-ortho-PBCの分画

これらの結果より，キシレンを多孔質化溶媒として使用したインプリント効果及びスルホキシド導入による保持効果があることが確認できた。

b. 共重合法により合成した固相について分画試験データをとり，検証を行った。

基材ポリマー2種類，多孔質溶媒3種類，機能性モノマーとしてスルホキシド含有の有無2種類の組み合わせにより計12種類の固相剤を合成した。合成した固相剤のSEM写真を図(2)-51示す。



図(2)-51　合成した固相剤のSEM写真

合成した12種類の固相剤の分画試験を行い，得られた結果を表(2)-15に示す。最も溶出量の多いフラクション量を数値で表している。数値が大きいほど保持容量が大きいことを表わす。全体的に見るとDVBよりEDMAの方が保持容量が大きくなる傾向が観察された。スルホキシドを有するPVSを導入する事で，DVBでは顕著な差は見られなかった。EDMAでは，PCBの保持容量が大きくなる傾向が観察された。EDMAでは，スルホキシドとPCBのフェニル基の間における相互の緩い作

用がはたきやすい事で保持容量が大きくなるのではないかと推察される。

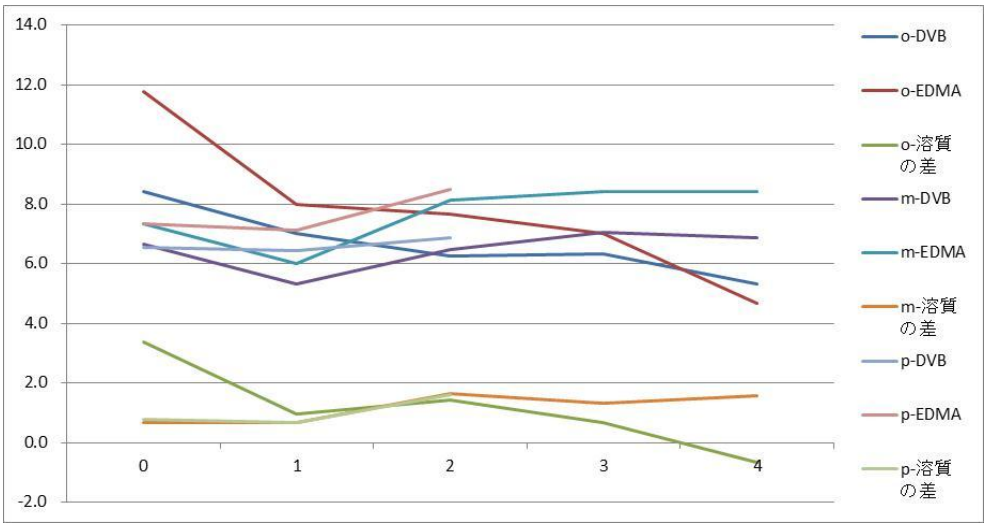
表(2)-15　固相剤の保持容量の測定結果

												Peak Top (ml)											
ポリマー粒子												DVB						EDMA					
多孔質化溶媒												xylene		DCB		TCB		xylene		DCB		TCB	
スルホキシド												なし	あり	なし	あり	なし	あり	なし	あり	なし	あり	なし	あり
塩素数		A環					B環					DV-Xy	DV-Xy-S	DV-VB	DV-DB-S	DV-TB	DV-TB-S	ED-Xy	ED-Xy-S	ED-DB	ED-DB-S	ED-TB	ED-TB-S
		2	3	4	5	6	2'	3'	4'	5'	6'												
1	#3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0												
2	#9	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	6	4	6	6	4	4	8	8	6	6	4	4
2	#8	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	6	4	6	6	8	6	8	10	8	8	4	6
3	#19	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	6	4	6	6	8	6	8	10	8	8	8	6
3	#31_28	0	0	1	0	0	1	0	(1)	1	0	6	4	6	6	6	6	8	6	8	8	4	6
4	#52	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	6	4	6	6	8	6	10	10	6	8	4	6
4	#70	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	6	4	6	6	8	6	10	10	8	10	4	6
5	#101	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	6	4	6	6	6	6	8	8	8	8	6	6
4	#81	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	6	6	6	8	6	8	8	15	8	15	4	8
5	#111	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	8	4	8	6	8	6	10	8	10	8	8	6
4	#77	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	10	8	8	10	10	8	20	25	15	15	8	10
5	#123	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	6	4	6	8	8	6	8	10	8	10	6	6
5	#118	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	8	6	6	8	8	6	10	15	10	10	6	10
5	#114	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	6	4	6	6	6	6	10	10	8	10	6	10
6	#153	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	6	4	6	6	6	6	8	8	8	8	6	6
5	#105	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	8	6	8	8	8	8	10	15	10	15	8	10
6	#138	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	6	4	6	8	6	6	10	10	8	10	6	6
5	#126_178	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	6	6	6	6	6	6	8	8	6	8	4	6
6	#167	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	8	4	6	8	8	6	10	15	8	10	6	10
6	#156	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	8	6	6	8	8	6	10	15	10	15	6	10
6	#157	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	8	6	8	8	8	8	10	20	10	15	8	10
7	#180	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	6	4	6	6	6	6	10	10	8	10	6	6
6	#169	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	8	8	8	10	8	10	20	20	15	20	8	10
7	#170	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	6	6	6	8	8	6	10	10	8	10	6	10
7	#189	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	8	6	8	8	8	6	10	15	10	15	6	10
8	#194	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	6	6	6	8	8	6	10	10	8	10	6	6
8	#205	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	6	6	6	8	6	6	10	15	8	10	6	6
9	#206	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	6	4	6	6	6	6	8	8	6	8	4	6
10	#209	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	6	4	4	6	6	4	6	6	4	4	4	4
												6.7	5.0	6.4	7.1	7.1	6.3	9.9	11.8	8.5	10.4	5.8	7.4

次に，置換位置による保持の効果について検証を行った。塩素の置換位置が*o-*,*p-*.*m-*の各々の場合について比較した。スルホキシドを導入していない場合，EDMA基材では，ノンオルト体ほど保持容量が大きくなる傾向が観察された（表(2)-16，図(2)-52）。

表(2)-16　スルホキシドなしの固相剤の置換位置による保持の傾向

	o-DVB	*o*-EDMA	*o*-溶質の差	*m*-DVB	*m*-EDMA	*m*-溶質の差	*p*-DVB	*p*-EDMA	*p*-溶質の差
0	8.4	11.8	3.4	6.7	7.3	0.7	6.5	7.3	0.8
1	7.0	8.0	1.0	5.3	6.0	0.7	6.4	7.1	0.7
2	6.3	7.7	1.4	6.5	8.1	1.7	6.9	8.5	1.6
3	6.3	7.0	0.7	7.1	8.4	1.3			
4	5.3	4.7	-0.7	6.9	8.4	1.6			

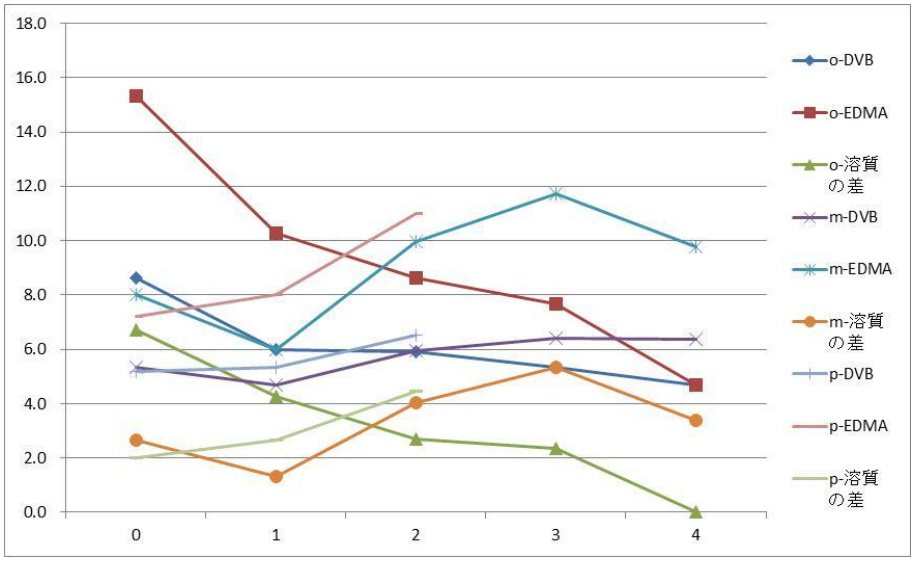


図(2)-52　スルホキシドなしの固相剤の置換位置による保持の傾向

EDMAにおいては，ノンオルト体の保持容量が大きいことが観察された。また*m*位に2個以上置換した場合と，*p*位に置換したした場合，保持容量が大きくなる傾向が観察された（表(2)-17，図(2)-53）。

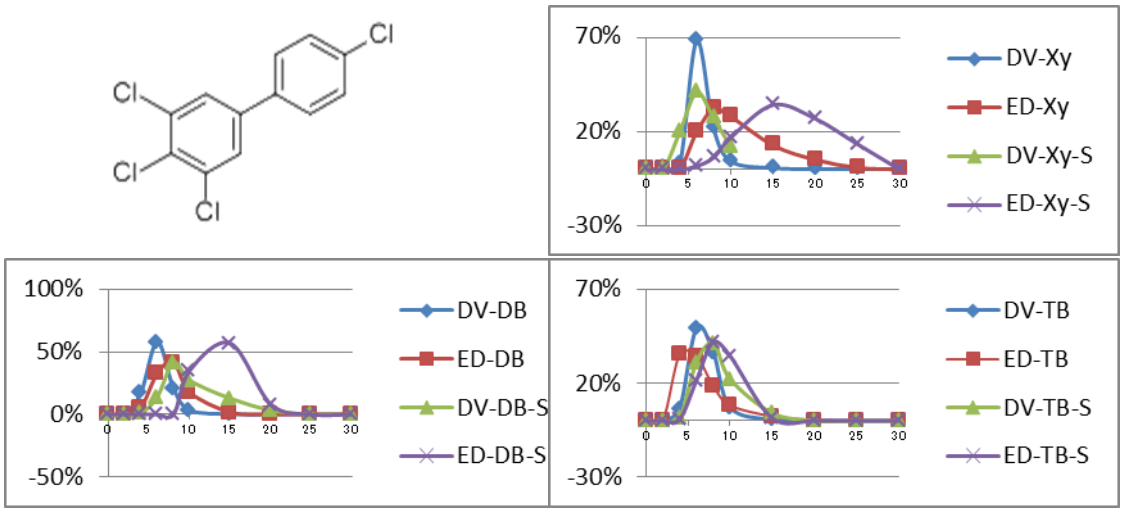
表(2)-17　スルホキシド含有固相剤の置換位置による保持の傾向

	o-DVB	*o*-EDMA	*o*-溶質の差	*m*-DVB	*m*-EDMA	*m*-溶質の差	*p*-DVB	*p*-EDMA	*p*-溶質の差
0	8.6	15.3	6.7	5.3	8.0	2.7	5.2	7.2	2.0
1	6.0	10.3	4.3	4.7	6.0	1.3	5.3	8.0	2.7
2	5.9	8.6	2.7	5.9	10.0	4.0	6.5	11.0	4.5
3	5.3	7.7	2.3	6.4	11.7	5.3			
4	4.7	4.7	0.0	6.4	9.8	3.4			



図(2)-53　スルホキシド含有固相剤の置換位置による保持の傾向

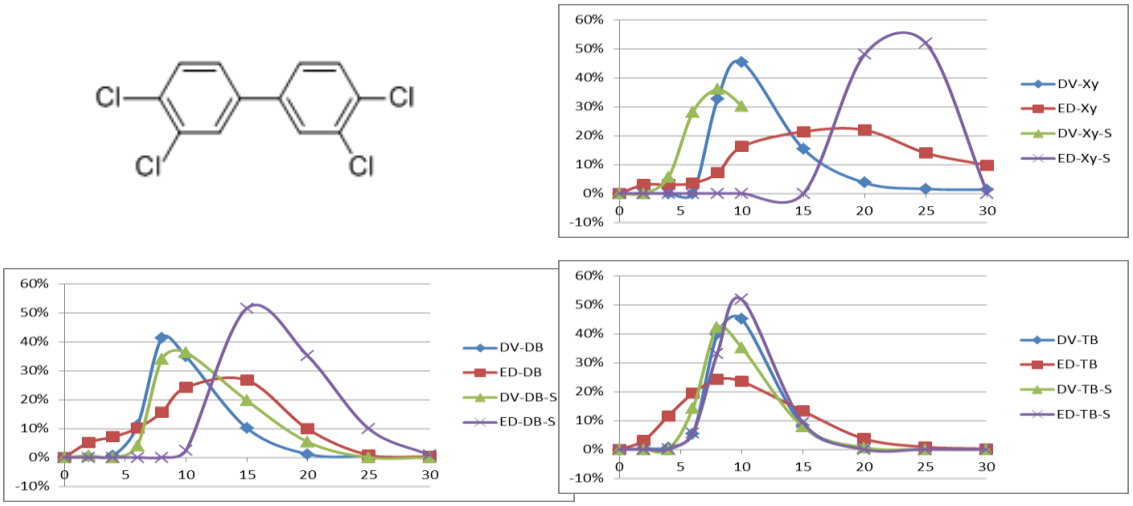
コプラナーPCBのうち，#81について溶出結果をグラフ化した（図(2)-54）。



図(2)-54　#81の溶出結果

*p*位に2個付加した構造のため横方向に分子長が長くなる事でEDMAの方が保持が大きいと考えられる。また，*m*位に2個付加しているため，DBの溶媒効果が出現，キシレンの*p*-,*m*-による溶媒効果も出現していると考察される。

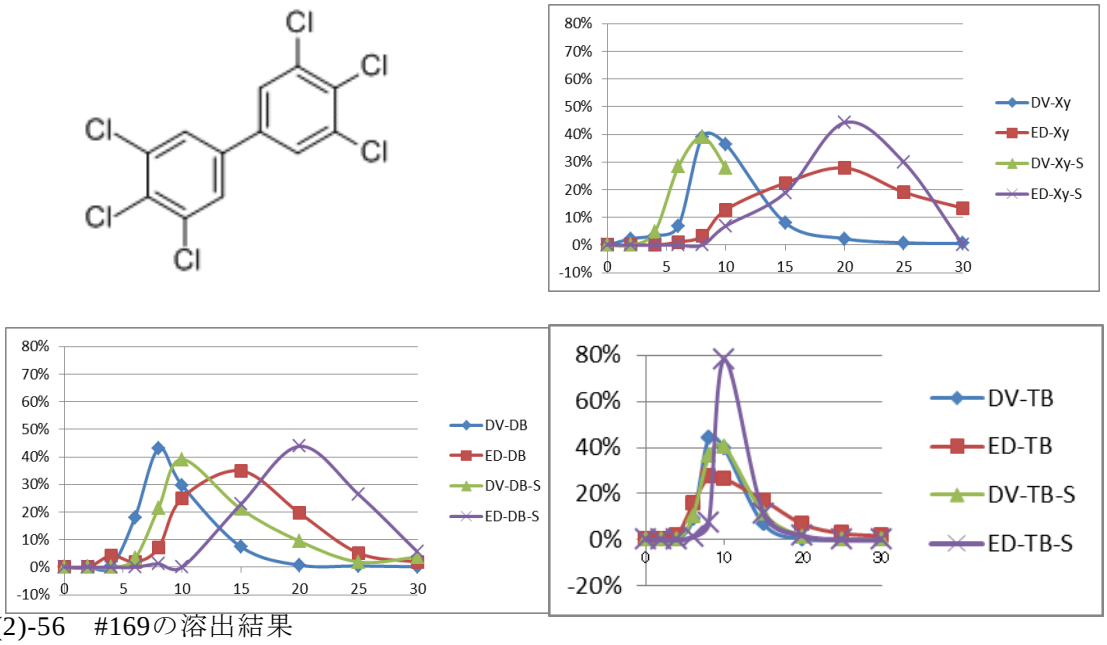
また，#77について同様にグラフ化した（図(2)-55）。



図(2)-55　#77の溶出結果

*m*位に各1個と*p*位のみに付加しているため，*o*-,*m*-,*p*-のキシレンの構造によるインプリント効果が表れていると推察される。スルホキシドによりフェニル基との緩い結合により更に保持が大きくなることが推察できる。*m*位に塩素の置換によりDBのインプリント効果も表れていると推察される。

さらに，同じくnon-ortho-PCBの#169について同様にグラフ化した（図(2)-56）。



図(2)-56　#169の溶出結果

*p*位に2個付加により横方向に分子長が長くEDMAの方が保持が大きいと考えられる。また，*m*位に塩素が置換しているため，キシレンでは，3種の異性体の*m*-,*p*-のインプリント効果が表れ，スルホキシドの有無に関係なく効果があると推察される。また，#81より保持が大きい傾向がある。

non-ortho-PCBについては，上記のように構造別の特徴が表れた結果となり，基材ポリマーの効果及び多孔質化溶媒による分子インプリント効果によるPCBの分離精製の可能性を確認できた。これらを以下の記述の通りにまとめた。

- 基材ポリマーとしては，EDMAが全体的にDVBよりもPCBに対しての保持容量が，大きいことが確認できた。また，極性の小さい場合は保持が小さくなる傾向があるため絶縁油に多く使われる鉱油（飽和脂肪属）との分離についても十分に可能であった。
- 多孔質溶媒としては，検討した3種類の溶媒のうち，DBは，キシレンよりもnon-ortho-PCBに対する保持容量が大きいことがわかった。また，TBは，常温で固体であるため合成の仕込み時に半量程度しか溶解しなかったが，保持容量を大きくするインプリント効果を確認できた。今後の合成に際して，多孔質溶媒の選定など設計を更に検討してこの特性を生かせる固相剤の合成を進めていきたい。

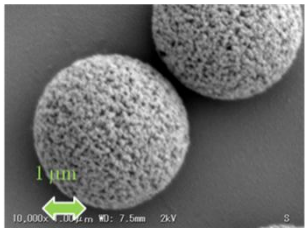
これらの結果より，PCBの構造により，キシレンやDBによる分子インプリント効果及びスルホキシドを導入することでの保持容量の差を利用し，PCBを分離できる固相剤の合成が可能であることが示唆された。

（２）難捕捉高親水性物質に対する疑似分子鋳型についての検討

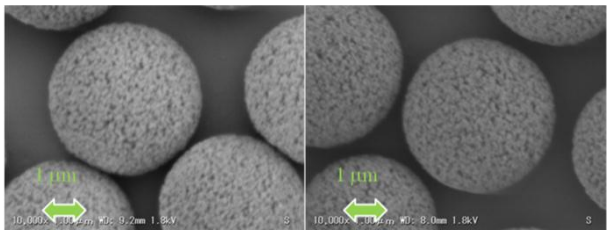
１）高親水性化合物のためのトラップ層開発の検討

a. 作製したポリマーの表面の評価

最初に，作製したポリマー粒子のSEM画像を図(2)-57と図(2)-58に示す。その結果，作製したポリマー粒子の平均粒子径は約6.3 μmであった。また，修飾の前後において，表面の構造に大きな違いは見られないことが示された。



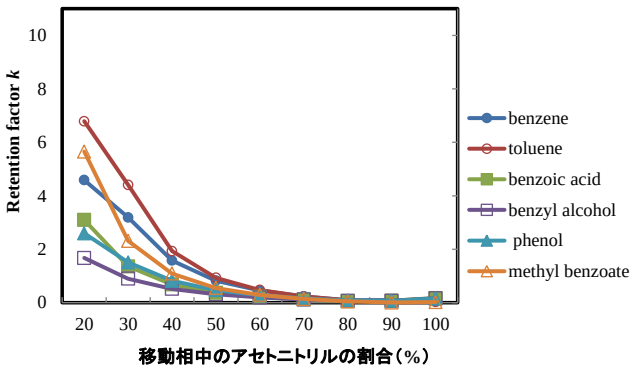
図(2)-57　修飾前のGDMAポリマー粒子のSEM画像



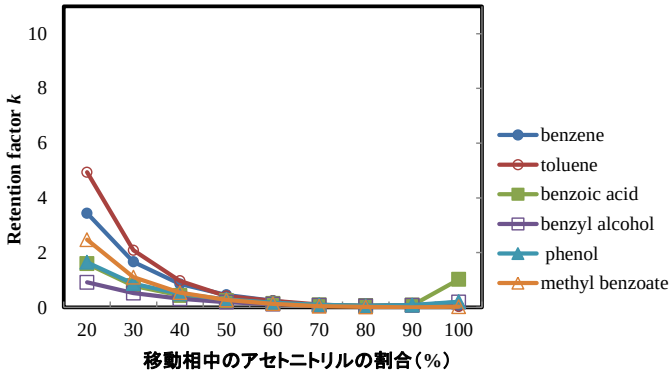
図(2)-58　修飾後のGDMAポリマー粒子のSEM画像（左：DMAEA-Q，右：MPC）

b. HPLCを用いた評価

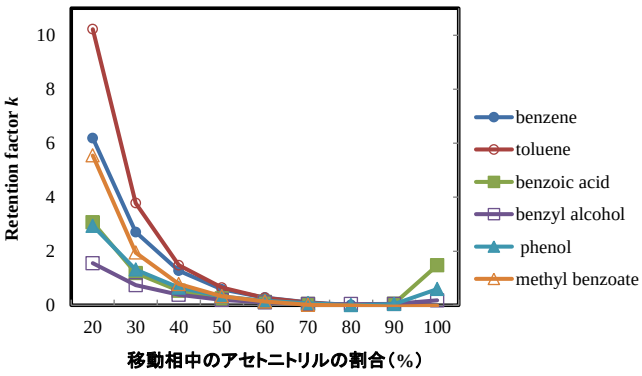
HPLCを用いて，調製したポリマー粒子を充てんしたカラムを評価した。移動相中のacetonitrile比を変化させた時の，一置換ベンゼンに対する保持変化を図(2)-59-61に示す。結果，未修飾のGDMA粒子充てんカラムは，移動相中のacetonitrile比の増加に伴い，全ての溶質の保持が順に減少した。次に，DMAEA-QとMPCを用いて表面修飾したGDMA粒子充てんカラムでは，acetonitrile比が90－100%で，ヒドロキシル基とカルボキシル基を含む溶質に対する保持が増加した。特に，MPCを用いて表面修飾したGDMA粒子充てんカラムにおいて，この現象が顕著に見られた。現段階では保持の強さが十分ではないが，今後さらなる検討を進め保持能力を高めていくことで，親水性化合物を効率的に捕捉・濃縮する分離媒体の開発が期待されるのではないかと考えられる。



図(2)-59　移動相中のacetonitrile比を変化させた時の保持係数*k*（GDMA）



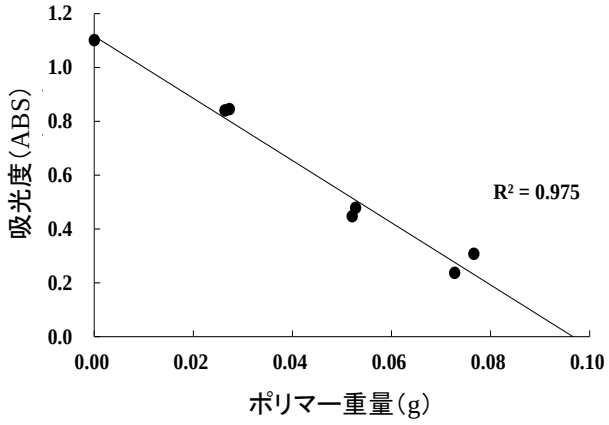
図(2)-60　移動相中のacetonitrile比を変化させた時の保持係数*k*（DMAEA-Q）



図(2)-61　移動相中のacetonitrile比を変化させた時の保持係数*k*（MPC）

２）官能基間距離認識による高親水性化合物の選択的分離に関する研究

a．コントロールポリマー内のビニル基量と平均ビニル基間距離



図(2)-62　上澄み溶液中のBr_2の吸光度.

まず，Cont.P内のビニル基の残存量，ビニル基間距離を確認するため，ビニル基と臭素の付加反応を利用してCont.P内のビニル基量，平均ビニル基間距離を算出した。反応終了後の各Cont.P量に対する上澄み溶液の吸光度を図(2)-62に示す。その結果，Cont.P量とBr_2の吸光度は比例関係にあり，

相関係数も0.975と高い値を示した。このことから，Br_2を用いたビニル基の定量法は有効であると考えられる。そこで，得られた直線から吸光度が0になる点でビニル基が完全にBr_2と反応したと仮定し，Cont.P内のビニル基量を算出した。その結果，Cont.P内のビニル基量は1.97×10^{-3} mol/gであり，反応に利用されなかったビニル基の割合は19.5%であることが示された。さらに，ビニル基間距離は13.14 Åであり，TBTA–SSA錯体（27.5 Å），BTAB–SSA錯体（31.0 Å）のビニル基間距離の半分以下の値であった。そのため，イオン結合型錯体をCont.Pの骨格表面に固定することが可能であり，距離固定化法が適用可能であることが示された。

b．距離固定ポリマーの物性と各鋳型分子に対する保持時間

まず，合成したIIPの平均粒子径，粒子径の変動係数，収率，イオン交換容量，BETパラメータを評価した結果，全てのIIPの各パラメータは同程度であった。次に，IIPをステンレスカラムに充てんし，HPLCを用いて各溶質（鋳型分子）に対する保持時間を算出した。まず，1官能のアンモニウムであるBTBAを注入した場合，全てのIIPにおいて，保持時間は同程度であった。このことからも，IIP表面の結合に関与しているイオン性官能基の数が同等であることが示された。

次に，2官能のアンモニウムであるTBTAを注入した場合，TBTAを鋳型分子としたTBTA–Pの保持時間が最も大きく，BTABを注入した場合，BTABを鋳型分子としたBTAB–Pの保持時間が最も大きかった。これらの結果から，TBTA–P，BTAB–Pにおいて，各々の距離に基づく認識場が構築されていると考えられる（表(2)-18）。

表(2)-18　各溶質に対する保持時間

	Acetone	BTBA	TBTA	BTAB
Cont. P	4.54	6.56	3.80	6.56
TBA–P	4.40	7.22	4.46	8.16
BTBA–P	4.74	8.10	4.70	9.58
TBTA–P	4.62	8.88	8.34	16.00
BTAB–P	4.66	9.02	6.68	18.82

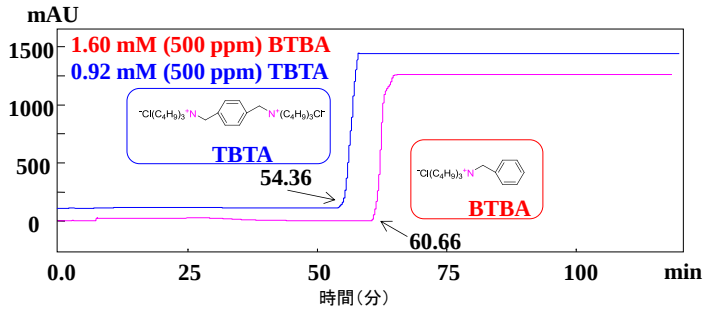
HPLC conditions

Column size, 150 mm × 4.6 mm i.d.; Flow rate, 0.5 mL/min; Mobile phase, acetonitrile/0.4 M NaCl aq. = 70/30; Temperature, 30 ^{o}C; Injection volume, 5.0 μL; Detection, PDA.

c．フロンタル解析

フロンタル解析はHPLCを用いて固定相の吸着容量を算出する手法である。例えば，イオン性の充てん剤に相互作用するイオン性化合物を含む移動相を通液した場合，得られた検出時間，流速，移動相の濃度からイオン交換容量を算出することができる。本検討では，TBTA–Pを充てん剤とし，移動相に1官能および2官能の鋳型分子を溶解することで，結合に関与している官能基数，結合状態（1点認識，2点認識）を評価した。まず，移動相として500 ppmのBTBAを通液した際のクロマトグラムを図(2)-63に示す。BTBAは，アンモニウム基を1つしか有さないため，BTBAの検出時間からTBTA–P内の結合に関与している官能基数を算出することができる。その結果，TBTA–Pの結合に関与している官能基の割合は，58.9%であった。BTBAの立体障害等により，結合に寄与して

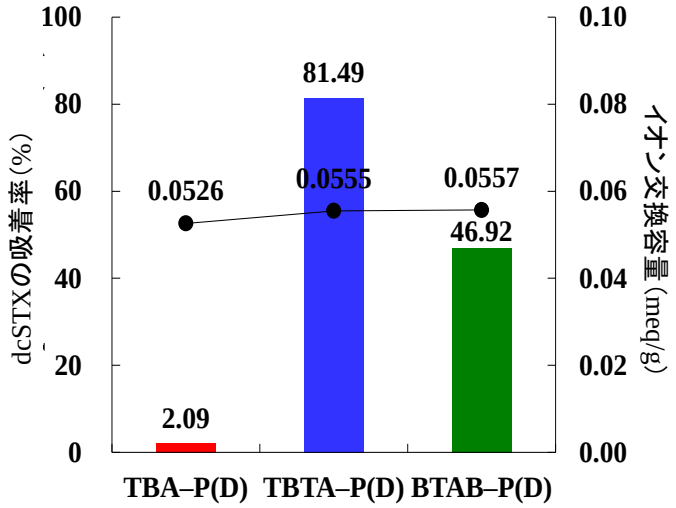
いないイオン性官能基もTBTA–P内に存在することも考えられるが，少なくとも合成時に用いたイオン性官能基の半数以上が結合に寄与していることが明らかとなった。次に，500 ppmのTBTAを通液した際のクロマトグラムを図(2)-63に示す。この結果から，2点認識の割合は98.5%であった。このことから，TBTAは2点認識によりTBTA–Pに吸着されていることが示された。この結果から，官能基間の距離固定したTBTA–Pは効果的にTBTAを2点認識していることが示された。



図(2)-63　TBTA-Pのフロンタル解析.

d. サキシトキシンの同族体を用いたバッチ吸着実験

鋳型分子を用いた種々の評価から，IITが有効な手法であることが示された。そこで，ターゲット分子であるSTXの同族体である無毒のdcSTXを用いて，鋳型分子の時と同様に選択的吸着が起こるか検討した。まず，IIPとdcSTX溶液（ムラサキイガイ抽出液）を用いて，バッチ吸着によりdcSTXに対する吸着量を算出した。各IIPの吸着率を図(2)-64に示す。その結果，全てのIIPのイオン交換容量は同程度にも関わらず，吸着率は大きく異なった。距離固定していないTBA–Pではイオン性官能基を有するにも関わらず，dcSTXがほとんど吸着されなかった。一方，イオン性官能基間距離を固定したTBTA–P, BTAB–PではdcSTXの吸着が観察され，特にSTXとイオン性官能基間距離が同等のTBTA–Pの吸着率は非常に高かった。このことからも，距離認識によりターゲット分子を選択的に吸着していることが確認された。

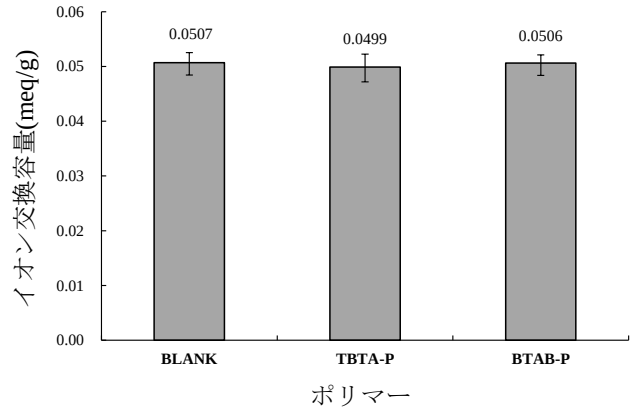


図(2)-64　各IIPのdcSTXに対する吸着率.

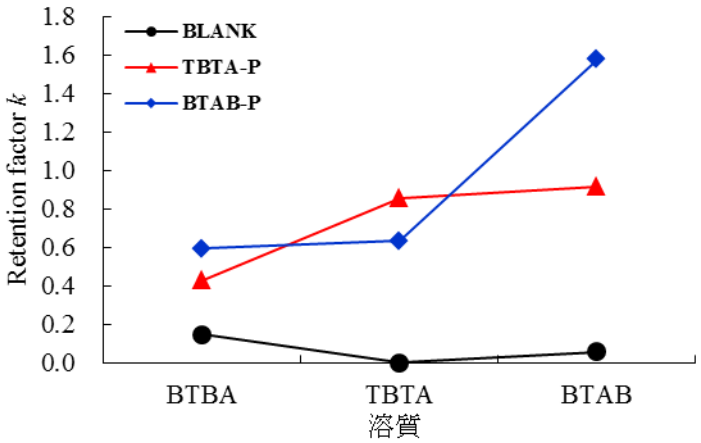
３）残留医薬品の分析前処理を目的とした分子鋳型の開発

a．合成したポリマー粒子の物性値とHPLC基礎特性（MCPA）

まず，合成したポリマー粒子のイオン交換容量を図(2)-65に示す。その結果，全てのポリマーのイオン交換容量はほぼ同じであり，ポリマー粒子表面へのスルホ基導入率は，全て100%と非常に高い値が得られた。また，図(2)-66に鋳型分子に対する保持係数を示すが，距離固定を行ったTBTA-P，BTAB-Pでそれぞれの鋳型分子に対する保持係数が逆転しており，距離固定の効果を確認することができた。ここで，BTBAは，一つのアンモニウム基を有する物質で，距離認識の影響のない比較対象として用いている。



図(2)-65　調製したポリマー粒子のイオン交換容量



図(2)-66　鋳型分子に対する各ポリマーの保持係数k

HPLC conditions

Flow rate, 1.0 mL/min; Mobile phase, methanol/0.4 M NaCl aq.=70/30 (v/v); Temperature, 30 °C; Injection volume, 5.0 μL; Detection, PDA.

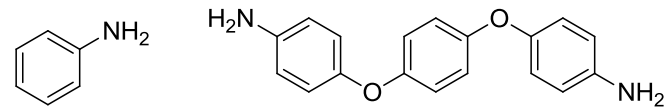
BTBA: benzyltributyl ammonium chloride

b．イオン性化合物およびMCPAに対する吸着特性

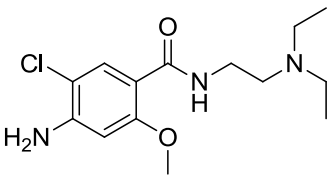
上述の検討で，合成したポリマー粒子が距離認識性を有することが確認された。そこで，種々のイオン性化合物およびMCPAに対する選択性を評価することで，距離固定の効果が実試料の

MCPAにも有効であるかどうか検討した（図(2)-67）。また，本検討ではアミノ基の解離を考慮し，移動相のpHを変化させながら評価を行った。移動相中の塩酸濃度の違いによる保持係数の変化を図(2)-68に示す。また，各移動相のpHと溶質のpK_aの関係を図(2)-69に示す。まず，アニリンにおいて，アミノ基が解離していない移動相中では，全てのポリマーで大きな違いは観察されなかった。また，塩酸濃度が高くなるにつれて，保持は減少した。これは，溶液中のイオン強度が増加することにより，アミノ基とスルホ基の相互作用が弱まったことが原因と考えられる。一方で，アミノ基が解離した場合，距離固定を行ったポリマー粒子とBLANK間で逆の保持挙動が観察された。また，APBを見てみると，pK_a付近で距離固定をしたポリマー粒子での保持が増加し，2つのアミノ基が完全に解離した条件では，その挙動がより顕著になった（TBTA-P，BTAB-Pは，90 minでは検出されず，90 minを保持時間として計算）。Anilineは1官能のイオン性化合物であり，APBはイオン基の距離が鋳型分子に比べて非常に長いため，距離固定の効果とは考えにくい。これらの結果から，距離固定をしたイオン結合型錯体とそうでないイオン結合型錯体の重合時の配列が異なっているのではないかと考えられる。距離固定していないポリマー粒子では構造の立体障害が起きにくいいため，グラフト重合のように機能性モノマーが密になっており，複数のイオン基が一つのイオン基として作用している可能性が考えられる。これらの結果から，イオン基の距離固定による認識部位の導入は，距離認識による選択性を増加させるだけでなく，結合に寄与する官能基数を増加できる可能性が示唆された。しかし，重合メカニズムの詳細については，さらなる検討が必要であり，今後の課題の一つとして，考えなければならない。

次に，イオン基の距離（N-N）が鋳型分子のイオン基の距離と類似しているMCPAでは，全ての移動相条件で1つのアミノ基が解離しており，2つのpK_aの値の差が大きいことから，環境水中や生体中でも同様の状態で存在していると考えられる。MCPAでも，その他のアミノ化合物と同様に，同一の解離状態では塩酸濃度が増加するにつれて，保持係数の低下が観察された。一方，MCPAでは，ポリマー間での保持係数の差が大きく，特に距離固定したポリマー粒子とそうでないポリマー粒子の差は非常に大きかった。このことから，相互作用が弱くなる非解離状態のアミノ基でも距離固定の効果は有効であることが示唆された。以上の結果から，鋳型分子をモノマー間に含むイオン結合型錯体を導入することで，距離固定による選択性の付与のみならず，機能性モノマーの結合状態を良好にする可能性が示唆された。さらに，距離固定の効果は，非解離状態のMCPAにも有効であることが示唆され，環境水中からの選択的捕捉が可能であることが示唆された。

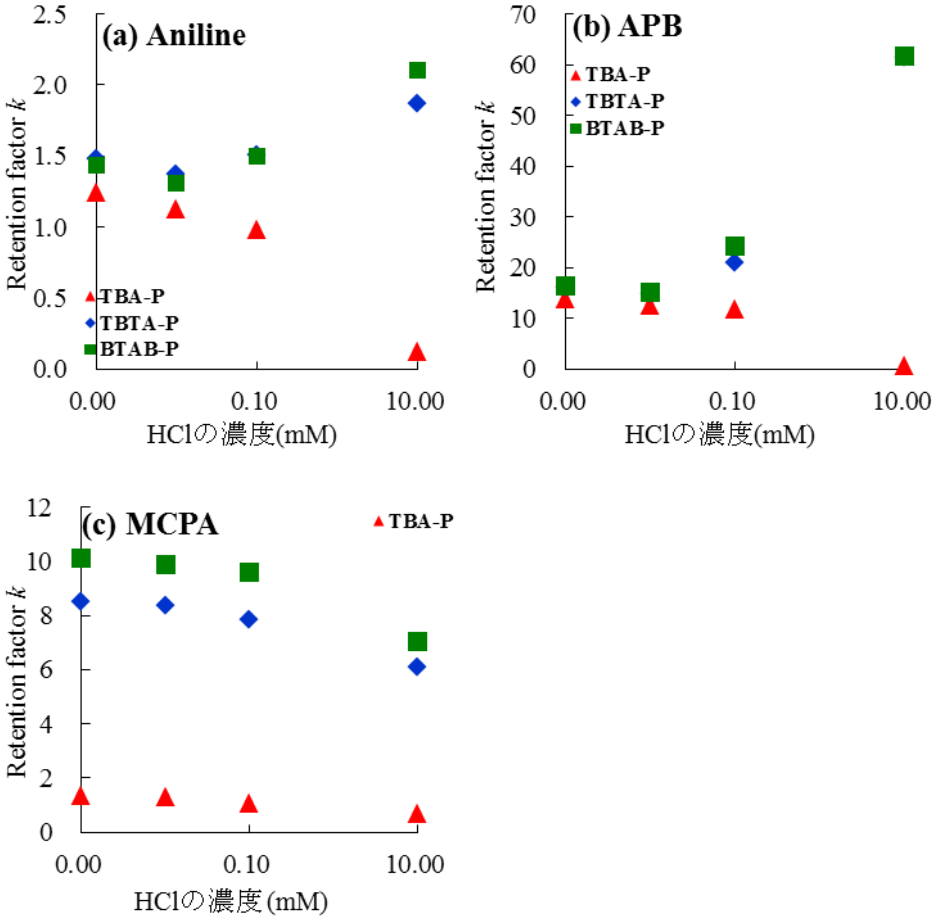


Aniline　　1,4-Bis-4-aminophenoxybenzene (APB)



Metclopramide (MCPA)

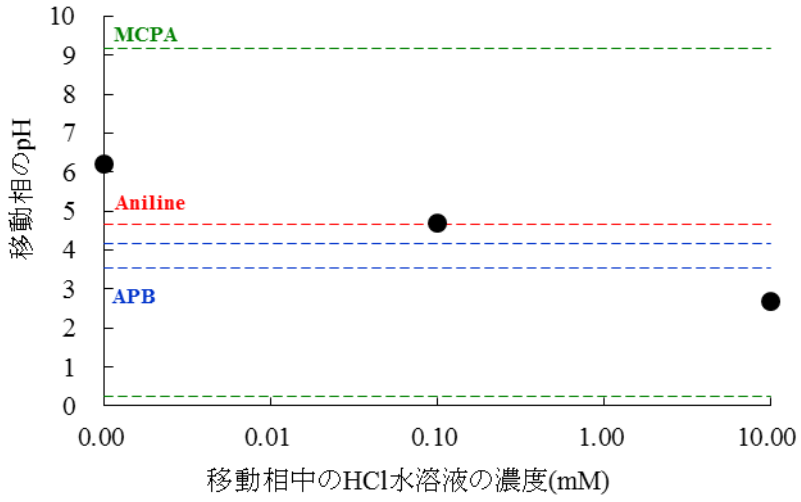
図(2)-67　評価した溶質の構造



図(2)-68　塩酸濃度の違いによる保持係数の変化

HPLC conditions

Flow rate, 1.0 mL/min; Mobile phase, methanol/HCl and 0.02 M NaCl =70/30 (v/v); Temperature, 40 °C; Injection volume, 5.0 μL; Detection, PDA.



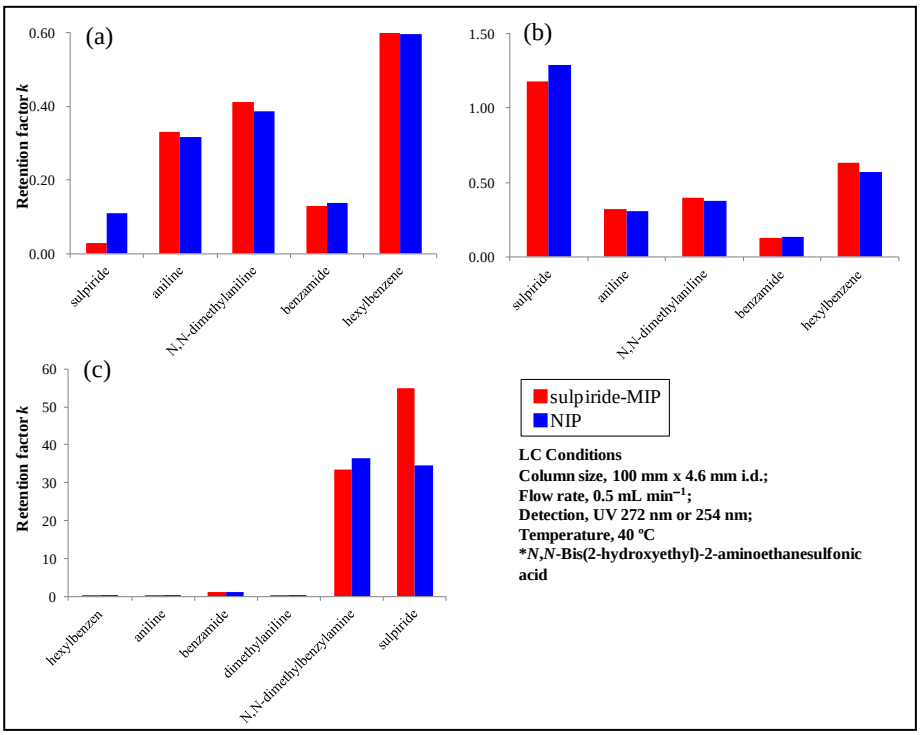
図(2)-69　塩酸濃度の変化に伴うpH変化と各溶質のpK_aの相関

c．HPLC評価におけるスルピリドに対する保持選択性（スルピリド）

分子インプリント法で合成した分子鋳型

図(2)-70(a)-(c)にsulpiride-MIPおよびNIPのHPLC評価結果を示した。また，表(2)-19にはスルピリドおよびその他の溶質のpK_aをまとめた。図に示すとおり，移動相に緩衝液を含む場合には，pHにかかわらずスルピリドに対する保持選択性は見られなかった。表(2)-19から，(a), (b)の条件ではスルピリドが解離状態であるが，塩基性の移動相を用いた場合にも，スルピリドに対する保持選択性は確認されなかった。

これに対し，移動相にacetonitrileのみを用いた場合には，sulpiride-MIPにおいて高い保持選択性が得られた。これらのことから，従来法で合成したMIPでは，水素結合による保持が支配的であり，水系の分析前処理剤としては不適であることが示唆された。



図(2)-70　sulpiride-MIPおよびNIPにおける各溶質の保持係数比

(a) acetonitrile/50 mM formate buffer (pH3.0) = 8/2, (b) acetonitrile/50 mM BES*-NaOH buffer (pH 7.0) = 8/2, (c) acetonitrile

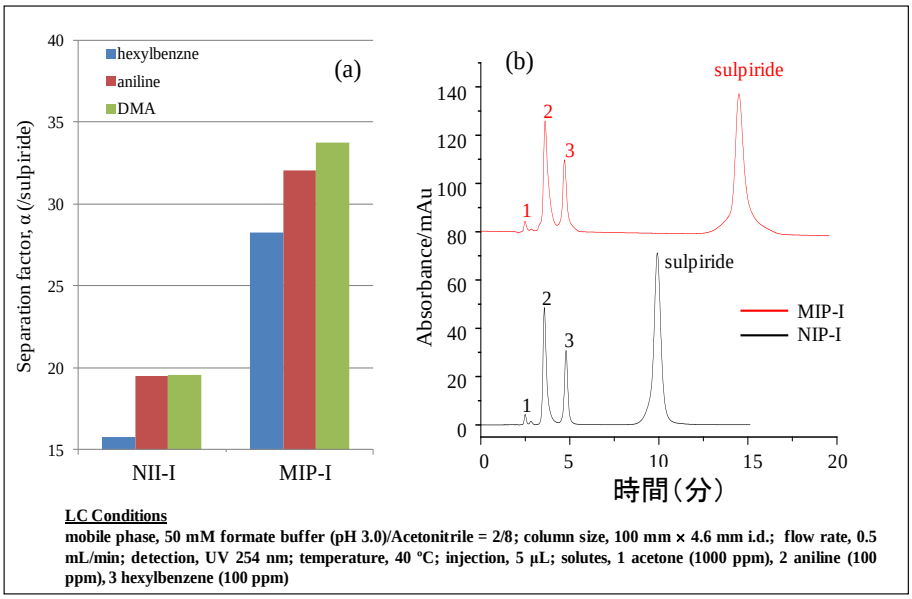
表(2)-19　スルピリドおよび塩基性溶質のpK_aとlog P値

	sulpiride	aniline	*N*,*N*'-dimethylaniline
pK_{a1}	10.2	4.67	5.39
pK_{a2}	9.00		
log P	1.34	0.90	2.38

官能基間距離固定化法で合成した分子鋳型

図(2)-71にギ酸緩衝液を含む移動相を用いた場合の各カラムでのスルピリドに対する分離係数およびクロマトグラムを示す。

これらの結果から明らかなとおり，MIP-Iでは官能基間距離認識に基づく高い選択的保持が見られた。さらに，非緩衝液，非水系溶媒中ではスルピリドの保持が大きく，溶出しないことから，潜在的には極めて高いスルピリドに対する保持能を有することが示唆された。



図(2)-71　MIP-IおよびNIP-Iにおける分離係数とクロマトグラム
（a）スルピリドに対する分離係数，（b）各カラムにおけるクロマトグラム

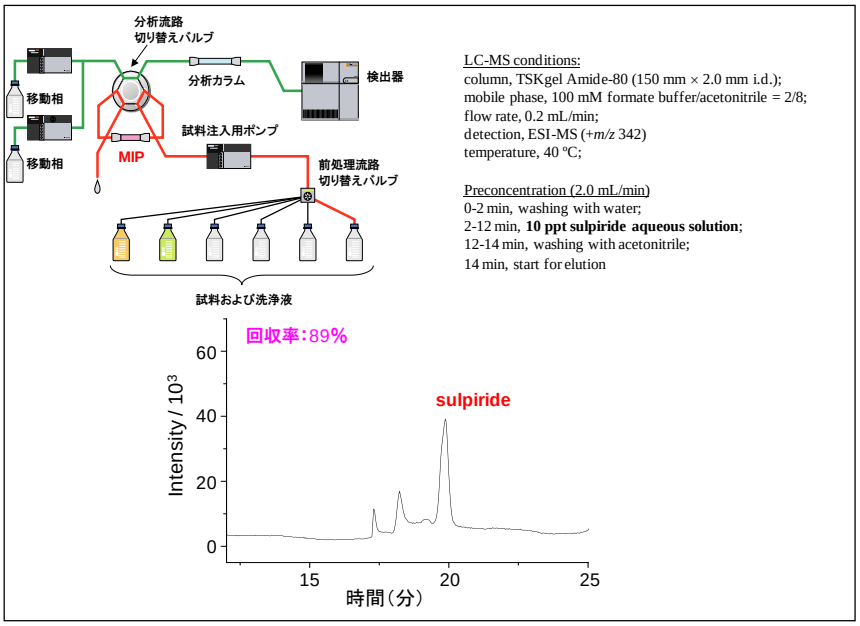
d. 水溶液中スルピリドに対する吸着性評価

上記で評価した4種のポリマー粒子（100 mg）をSPE用カートリッジに充てんし，水溶液中のスルピリドに対する吸脱着性能を評価した。試料として，100 ppmスルピリド水溶液を流し，溶出液をHPLCで分析した結果，sulpiride-MIP，NIP，NIP-Iでは，はじめの3.0 mLまでにスルピリドが溶出することが観察され，吸着性能が低いことがわかった。一方，MIP-Iについては，30 mL以上でもスルピリドの吸着が確認され，高い保持能を有することが明らかとなった。

さらに，MIP-Iに吸着したスルピリドは，acetonitrileやmethanol等の有機溶媒のみの洗浄では脱着せず，高濃度の塩溶媒を含む有機溶媒でのみ回収できることがわかった。これは，従来のSPEを用いる場合と比較すると，有機溶媒による洗浄過程を組み込めることから，疎水性物質を除去し，より選択的にターゲット物質を濃縮できる点で，効果的な分析前処理が可能になると予想された。そこで，このプロセスを試行するために，オンラインSPE-HPLCシステムによる濃縮を試みた。

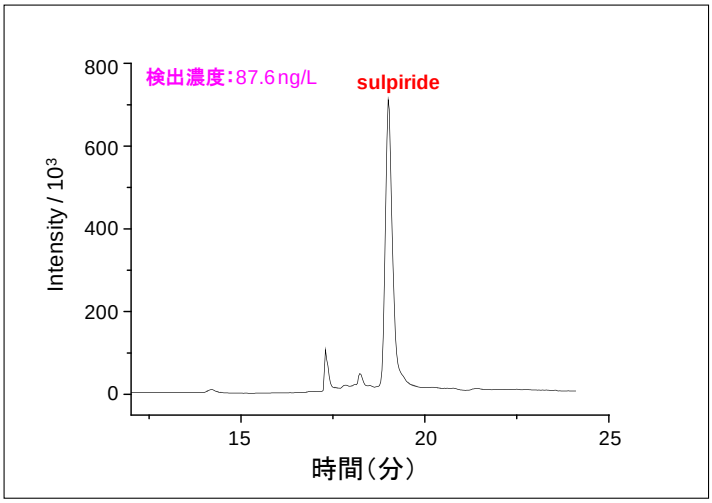
e. オンラインSPE-HPLCシステムによるスルピリドの分析前処理と定量分析

図(2)-72に示すオンラインSPE-HPLCシステムにおいて，前処理カラム部にMIP-I充てんカラムを用いてスルピリド水溶液の濃縮を行った。検出器に質量分析計（MS）を導入することで，pptレベルの濃縮・定量を試みた。本検討では，スルピリド標準品を用いて，前処理段階におけるacetonitrileによる洗浄工程を含む前処理を施し，定量性を検証した。その結果，図(2)-72に示すとおり，オンラインSPE-HPLC-MSにおいてスルピリドの濃縮が達成され，100 pptスルピリド水溶液を用いた場合の回収率は89%となった。これらの結果から，官能基間距離固定化法により合成したMIP-Iがスルピリドの分析前処理と定量分析に寄与することが明らかとなった。



図(2)-72　オンラインSPE-HPLC-MS分析の流路図とMSクロマトグラム

上記のオンラインSPE-HPLCシステムにおいて，低濃度のスルピリドの定量分析が可能となった。そこで，次に実試料を用いた同手法での定量分析を試みた。試料には，年間を通してスルピリドが高濃度で検出されている京都市内の河川水（西高瀬川）を選定した。採水した試料を0.22 μmのメンブランフィルターを用いてろ過し，不溶物を除去した後，直接前処理試料として用いた。図(2)-72と同手法を用いて得られたMSクロマトグラムを図(2)-73に示す。図に示すとおり，夾雑成分の影響がほとんど見られない，良好なクロマトグラムが得られた。さらに，得られたクロマトグラムと標準品の直接注入から得られた検量線からスルピリドの濃度を算出した結果，87.6 ng/Lであることが明らかとなった。この結果は，既報の濃度と比べると若干低い値であるが，採水点が異なる点が原因であると思われる。今後，内部標準物質を用いた検量線作成および添加回収実験を検討することで，同手法によるスルピリドの定量分析が可能になると期待できる。

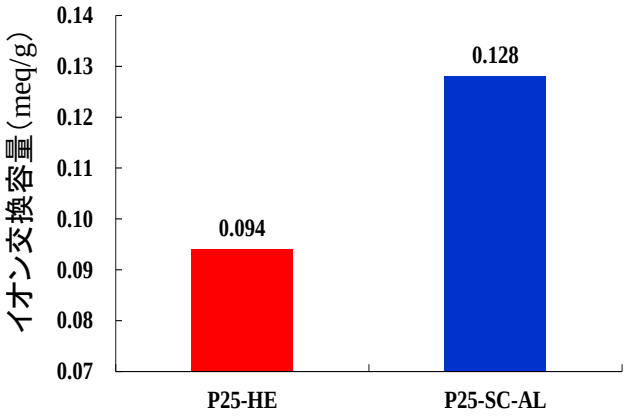


図(2)-73　実河川試料を用いたオンラインSPE-HPLCシステム分析
分析条件：図(2)-72と同様

４）光触媒ハイブリッド分子認識材料による高親水性化合物の選択的吸着・分解に関する研究

a．ハイブリッド材料の吸着性能

本検討では，まず，イオン性官能基の距離固定をせずに，ハイブリッド材料を合成し，吸着性能および光安定性を評価した。まず，図(2)-74に異なる調製法で合成したハイブリッド材料のイオン交換容量を示す。その結果，直接法で合成したハイブリッド材料に比べて間接法で合成したハイブリッド材料のイオン交換容量が高かった。このことから，ラジカル重合を用いることによって多くのイオン性官能基を修飾できたと考えられる。

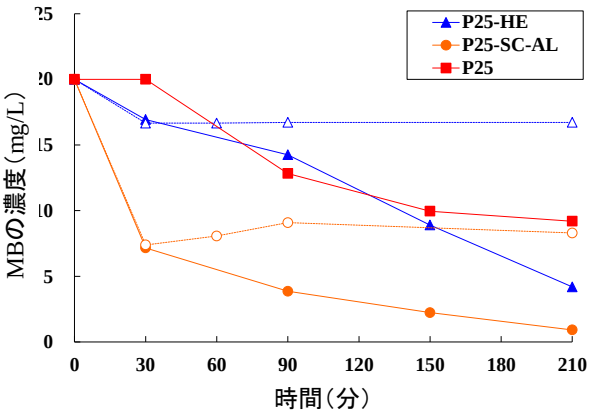


図(2)-74　各ハイブリッド材料のイオン交換容量

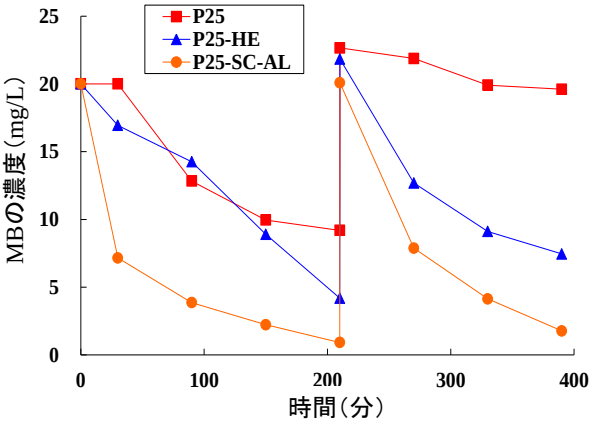
b．Methylene blueを用いたハイブリッド材料の評価

本検討では，分解実験にしばしば利用されるmethylene blue（MB）を用いて，修飾部位の光安定性および吸着・分解性能を評価した。20 ppmのMB水溶液中にハイブリッド材料を分散し，UV照射した際の上澄み溶液のMB濃度の変化を図(2)-75に示す。この図において0分はMB水溶液とハイブリッド材料を混合した時間であり，30分は超音波振とう後の上澄み溶液のMB濃度を示している。そのため，0-30分のMB濃度の減少はハイブリッド材料への吸着を示しており，30分以降のMB濃度の減少はMBの分解を示す指標となる。ここで，吸着と分解の効果を明らかに（吸着平衡を確認）するために，UV照射しない場合のMB濃度の変化も併せて記載する。その結果，MBの効果的な減少が観察され，減少率の順も同様であった（P25-SC-AL > P25-HE > P25）。また，UV照射しない場合，30分以降のMB濃度はほぼ一定であった。この結果から，30分以降のMBの減少は吸着平衡によるものではなく，分解であることが確認された。そこで，修飾部位の光安定性を評価するために，MB濃度が減少した210分の時点で初期濃度と同じになるようにMB溶液を追加し，同様に検討した。仮に修飾部位が分解していた場合，MBの減少挙動は大きく低下すると予想される。その結果，MBを追加した210分以降でも30分以降と同様のMBの減少が観察され，修飾部位の分解が抑制された（図(2)-76）。これは，水溶液中に有機物が存在するため，発生したラジカルが修飾部位だけでなく溶液中の有機物に分散することやMBが光を吸収したことにより，TiO_2が吸収する光エネルギーが低下したなどの要因が考えられる。この結果から，合成したハイブリッド材料は有機物が存在する条件下では，光安定性が高いことが示唆された。一方，P25では210分以降の分解性能が低下した。TiO_2の劣化機構に関しては様々な研究がされており，汚染物質の吸着や分解した

炭素の析出による有効比表面積の低下やバンド構造の変化などが原因と考えられる。本検討での劣化の原因は明らかではないが，合成したハイブリッド材料では吸着性能や分解性能の劣化が抑制されており，有機物の吸着・分解に関して，P25単独より有効であることが示された。

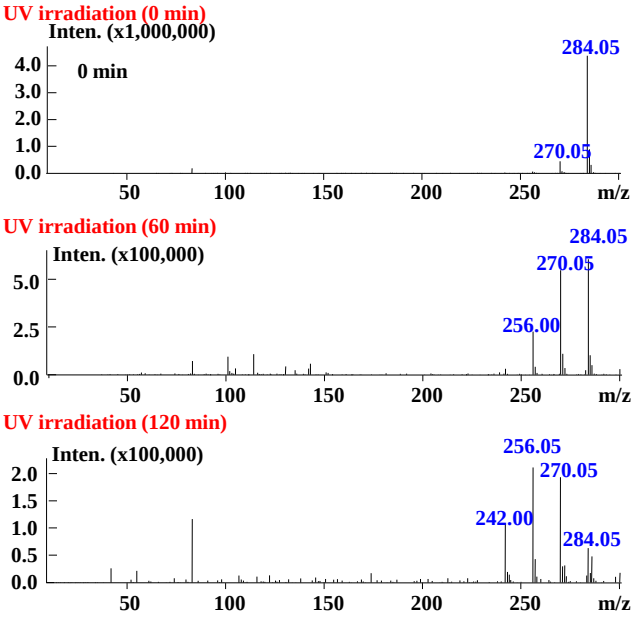


図(2)-75　MBの吸着・分解挙動（UV照射の影響）
（実線, UV irradiation;　点線, non–UV irradiation）



図(2)-76　MBの吸着・分解挙動（光安定性）

ここで，MBの分解に関して上澄み溶液の吸光度を一定の波長で測定しているため，MBが光触媒によりどのような影響を受けているのか明らかではない。例えば，MBが分解ではなく還元された場合，構造に大きな変化はないがMBの色素は脱色され，吸光度は減少する。そこで，この吸光度の減少が還元あるいは分解のいずれに起因するかを明らかにするために，上澄み溶液をLC/MSで分析することによって，分解生成物の同定や分解過程を評価した。図(2)-77に図(2)-76で評価したP25-SC-ALの上澄み溶液のMSスペクトルを示す。未照射時（0分）ではMBのピークおよびazure Aと予想されるピークが観察された。UV照射を60分した時点ではMBのピークが減少し，azure Aのピークとazure Bのピーク強度が相対的に増加した。さらに，UV照射を120分した時点では分子量が14減少したazure Cのピークが観察された。また，UV照射時間が長くなるにつれてピーク強度の絶対値も低下しており，ハイブリッド材料はMBを還元しているのではなく，メチル基を順次脱離することで，効果的に分解していることが明らかとなった。メチル基から脱離している原因としてはC-N結合の結合エネルギーがその他の部位に比べて低いことが考えられる。また，他のハイブリッド材料でも分解速度に違いはあるものの（MBの減少が早いほど，反応が早く進行するが，分解生成物に変化はない），同様の分解生成物が得られ，MBを効果的に分解した。



図(2)-77　上澄み溶液のMSスペクトル

c. 距離固定したハイブリッド材料の吸着性能評価

上記までの検討で，合成したハイブリッド材料はイオン性化合物に対して吸着・分解性能を示す結果が得られた。さらに，合成法を変化させることにより，吸着性能や修飾部位の光安定性が変化した。そこで，官能基間距離固定化法によりハイブリッド材料に認識場を構築し，吸着・分解性能を評価した。はじめに，1官能のイオン性化合物と2官能のイオン性化合物に対する吸着性能を評価し，吸着量の変化から距離固定の効果を検討した。ここで，距離固定の効果を明らかにするために，非距離固定型ハイブリッド材料と距離固定したハイブリッド材料の各イオン性化合物に対する吸着量の比を算出し，数値として評価した（表(2)-20）。MBに対する吸着量はイオン性官能基の結合に関与している官能基量，TBTAに対する吸着量は2点認識による官能基数と考えると，吸着量の比を比較することで簡易的に距離固定の効果を算出できると考えられる。その結果，全てのハイブリッド材料でMB＜TBTA（高濃度）＜TBTA（低濃度）の順で吸着量の比が増加し，イオン性官能基の距離固定することで，鋳型分子のTBTAを選択的に吸着したと判断した。

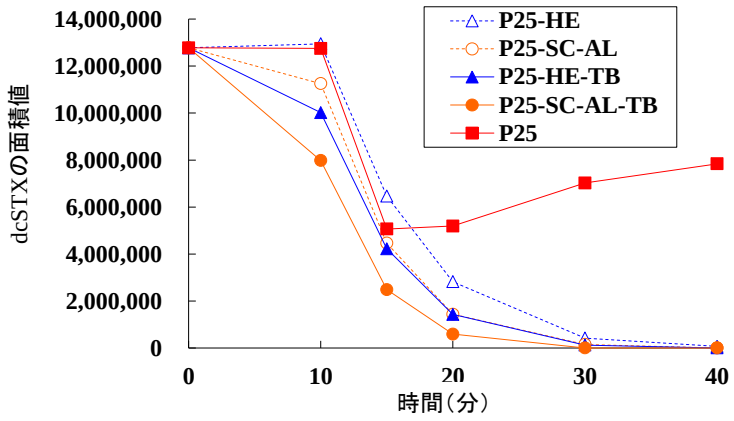
表(2)-20　距離固定の有無によるハイブリッド材料の吸着比

	Immobilization / Non–immobilization		
	MB	TBTA	
		50 μmol/L	0.25 μmol/L
P25–HE–TB / P25–HE	2.47	10.77	---
P25–SC–AL–TB / P25–SC–AL	0.41	1.14	1.66

d. ターゲット分子に対する吸着・分解性能評価

官能基間距離固定化を用いて合成することにより，官能基間距離に基づく分子認識能の発現が示唆された。そこで，ターゲット分子であるdcSTXを用いた場合，官能基間距離に基づく選択的吸着性能，光触媒による分解の効果が得られるか検討した（図(2)-78）。本検討では，dcSTXの熱による分解の可能性を考慮し，超音波振とう後にdcSTXを注入し，10分間かく拌した後，UV照射した。まず，UV照射していない10分の時点で吸着量に差が観察された。距離固定したハイブリッド材料では吸着量が大きく，選択的にdcSTXを吸着していることが観察された。さらにUV照射することで吸着量の差に基づき，dcSTXが速やかに分解されていることが明らかとなった。これらの結果から，擬似実試料中でターゲット分子を選択的に吸着し，分解する目的を達成することができた。

今回，2つの方法により合成したハイブリッド材料はどちらも有機物の存在条件下では修飾部位の光安定性が高く，イオン性化合物を分解することが確認できた。ターゲット分子の化学的安定性や濃度に応じてハイブリッド材料を選択することにより，特定の化合物のみを選択的に吸着・分解することは可能と考えられ，環境浄化剤として利用できる可能性が示された。



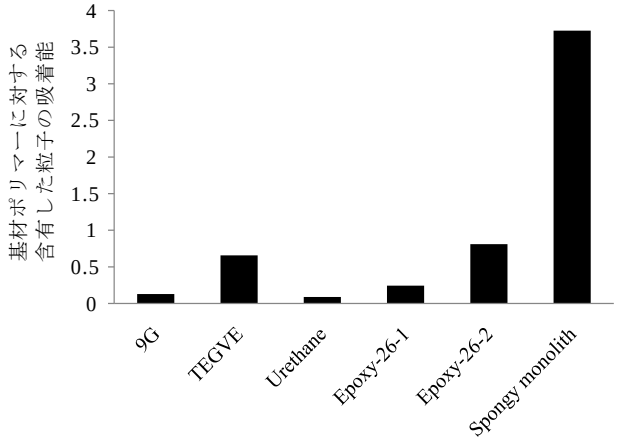
図(2)-78　疑似試料中のdcSTX分解挙動

５）多孔性膜と分子鋳型のハイブリッド化技術に関する検討

先の成果で，多孔性材料と擬似分子鋳型のハイブリッド化に対する基本的な可能性が見いだされていた。しかし，目標とする30%含有率が達成されておらず，擬似分子鋳型30%以上のハイブリッド体合成を目指し，種々の多孔体による評価を行った。

a. BPA吸着率と粒子含有ポリマーにおける粒子の稼働率の比較

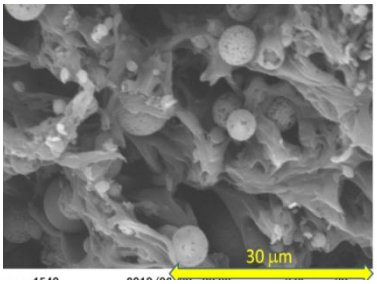
図(2)-79に基材ポリマーに対する含有した粒子の吸着能を示す。結果，スポンジモノリスを用いた場合にのみ，吸着能が確認できた。



図(2)-79　基材ポリマーに対する含有した粒子の吸着能

b．SEM観察結果

スポンジモノリスを除く，すべてのハイブリッド体で，ポリマー粒子の露出は確認されず，吸着能の結果と一致する。一方で，図(2)-80に示すとおり，スポンジモノリス基材のハイブリッド体では，ポリマー粒子の露出が確認できた。以上の結果より，今回用いた粒子とは異なる擬似分子鋳型を含有させることにより，新たなハイブリット型のカラム充てん剤としての利用が期待できる。

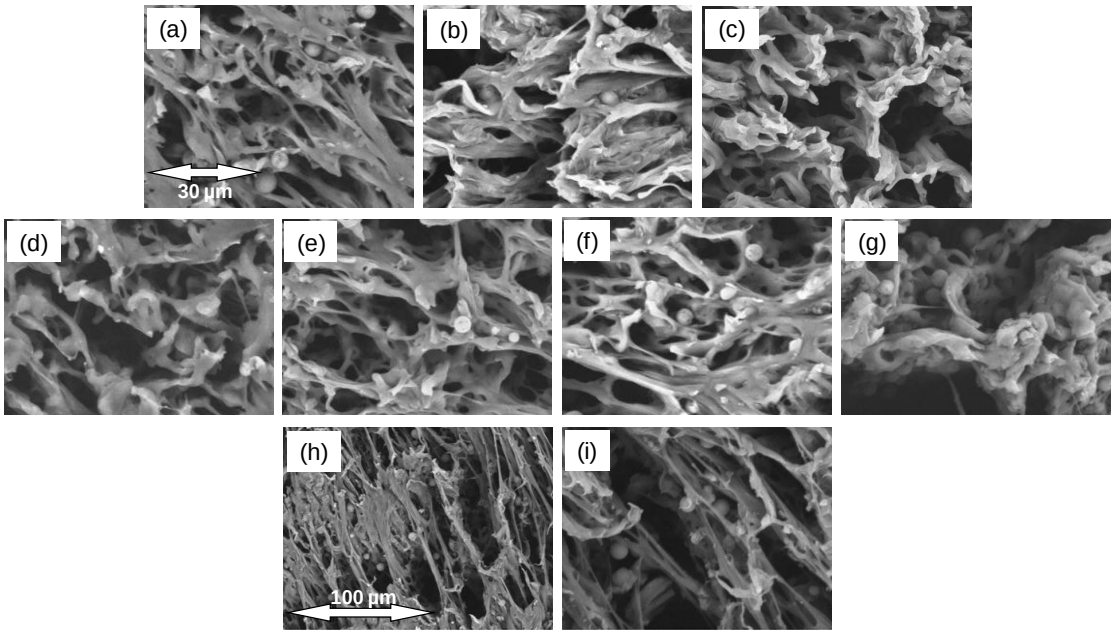


図(2)-80　スポンジモノリス30%のSEM観察写真

c．ハイブリッド体のモルフォロジー変化

図(2)-81にハイブリッド化で得られた各材料のSEM写真を示す。EDMAを基材とするポリマー粒子では，配合割合に応じて，基材細孔表面に露出した粒子がはっきりと確認できる。それに対して，DVB粒子およびグラファイトカーボン粒子では，粒子が基材内部に取り込まれていることが分かる。一方，SEM写真は省略するが，無機粒子である酸化チタンを用いた場合には，洗浄後に粒子が完全に脱落し，ハイブリッド化されることはなかった。これからのことから，ポリマー粒子，スポンジ基材，孔径（助）剤，それぞれの親和性がハイブリッド化に影響することが予想される。また，先の報告結果で，EVAを基材とするスポンジモノリスは，多環芳香族類に対する保持選択性が高いことが明らかとなっている。この点を考慮すると，芳香族系であるグラファイト，DVBは基材に対しての親和性が高く，合成時におけるEVAの溶融と共に骨格に取り込まれたと予想される。また，EDMA粒子ではEVA骨格表面に粒子が固定化されている。この粒子は，種々の溶媒中での超音波洗浄でも安定であることから，物理化学的な安定性を有している。この原因として，粒子の表面の融解によるEVAとの接着が考えられたが，種々の熱分析の結果からは，反応を

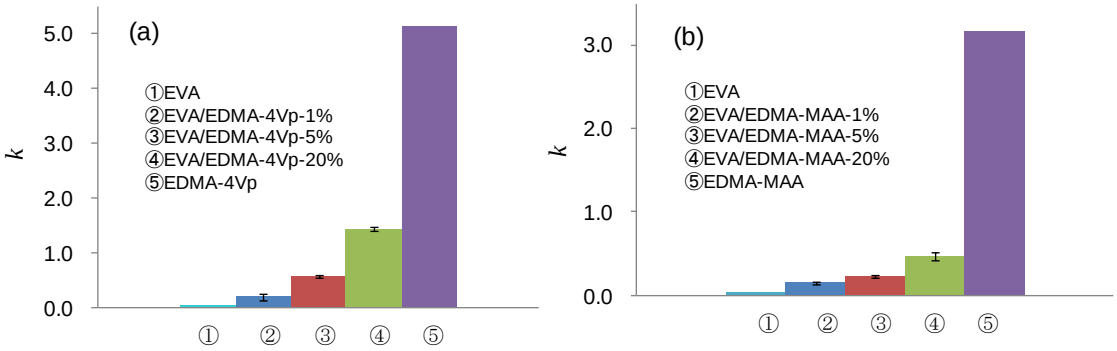
支持する結果は得られなかった。この点については，科学的な根拠に基づくさらなる評価が必要である。



図(2)-81　ハイブリット化スポンジモノリスのSEM写真
(a: EVA/EDMA-5%, b: EVA/DVB-5%, c: EVA/gra-carb-5%, d: EVA, e: EVA/EDMA-4Vp-1%, f: EVA/EDMA-4Vp-5%, g: EVA/EDMA-4Vp-20%, h,i: EVA/EDMA-SSA-20%)

d. イオン交換型ポリマー粒子ハイブリッド化における機能評価

MAA，4Vpを用いて合成したハイブリッド体について，HPLCにおける安息香酸，pyridineに対する保持を評価した。評価には，ポリマー粒子の仕込み比が異なるハイブリッド体を使用し，仕込み比に応じて，相対する電荷を持つ溶質に対して定量的な変化が見られるかを観察した。図(2)-82にそれぞれのハイブリッド体充てんカラムにおける保持係数を示した。ここで，いずれの図においても⑤は，ポリマー粒子のみを充てんした場合の保持係数を示しており，静電相互作用によって，各溶質が保持されていることが示されている。同時に，MAA，4Vpいずれのハイブリッド体においても，合成時の配合比の増加に伴い，相対する溶質の保持係数が増加していることが分かる。この保持の増加の定量性について，仕込み時のポリマー粒子量比に対する保持係数のプロットはいずれのハイブリッド体においても，直線的な結果を示し，相関係数が0.99以上となった事から，イオン交換能が定量的にハイブリッド化されたと言える。



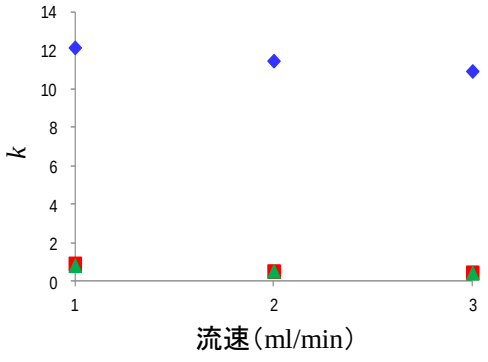
図(2)-82　4Vp，MAAを含むポリマー粒子ハイブリッド体における溶質の保持変化

HPLC conditions

Column size, 100 mm × 4.6 mm i.d.; Mobile phase, acetonitrile/0.1% formic acid aq. = 99/1(a), acetonitrile(b); Flow rate, 0.5 mL/min; Detection, PDA; Temperature, 40 oC; Solutes, 100 ppm benzoic acid-5 µL(a), 100 ppm pyridine-5 µL(b)

e．イオン交換能と流速変化

上記評価で，イオン交換基含有型のポリマー粒子が効率的にハイブリッド化されることが示された。そこで，本研究の重要な目的である，ハイスループット条件でのハイブリッド体の昨日を評価することを目的として，HPLC評価における流速を変化させて，その保持の変動を観察した。評価には，EDMA-SSAを20%ハイブリッド化したEVA/EDMA-SSA-20%，EVA/EDMA-20%，EVAを使用した。溶質としては，特定化学物質として登録されている，*N*,*N*-dimethylaniline（DMA）を用いた。流速を変化させた時のDMAの保持係数の変化を図(2)-83に示す。この図に示すとおり，まず，スルホ基に由来するDMAへの保持が，EVA/EDMA-SSA-20%でのみ確認される。さらに，流速を変化させても，保持係数の変化はほとんど見られないことから，得られたハイブリッド体は，高流速化でもイオン交換能を維持したままであると言うことができる。



図(2)-83　EDMA-SSAハイブリッド体おける流速変化と保持変動

HPLC conditions

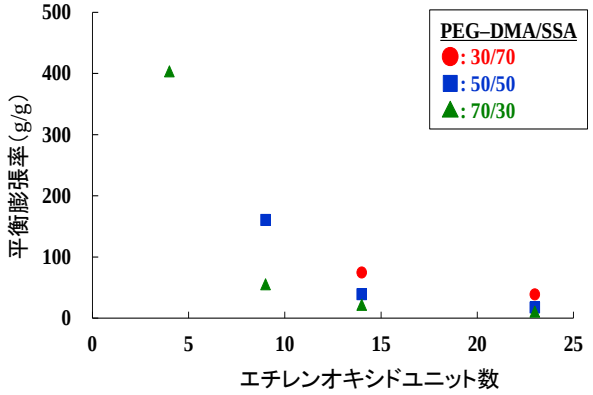
Column size, 100 mm × 4.6 mm i.d.; Mobile phase, methanol/0.1 mM HCl aq. = 90/10; Detection, PDA; Temperature, 40 ºC; Solutes, 100 ppm DMA-5.0 µL

◆EVA/EDMA-SSA-20%，▲EVA-EDMA-20%，■EVA

６）距離認識を利用した伸縮性ヒドロゲルの開発とタンパク質の選択的吸着に関する研究

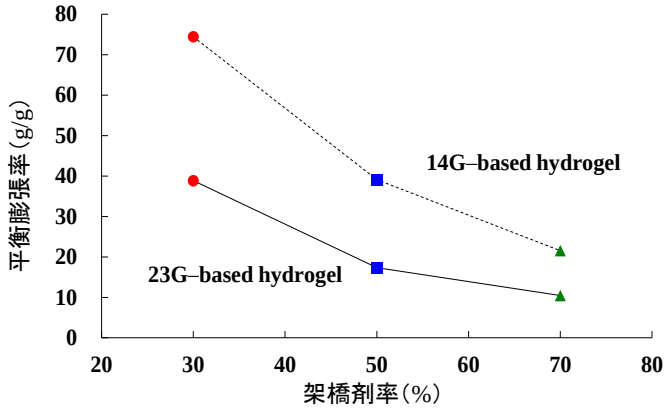
a．エチレンオキシドユニット数の違いによるヒドロゲルの平衡膨張率の変化

本検討ではまず，エチレンオキシドユニット数の違いによるPEG gelの平衡膨張率の変化を観察した。ここで，機能性モノマーとしてスルホ基を有するSSAを用いた。また，PEG-DMAの分子量が小さい場合，疎水性が高く，水に溶解しないため，多孔質化溶媒はmethanol水溶液を用いた。まず，架橋剤のPEG-DMAと機能性モノマーのSSAのモル量を3.0 mmol，溶媒量を14 mLに固定してPEG gelを合成した。ここで，固化したが，洗浄時に破断し，断面積が測定困難であったPEG gel，もしくは固化していないPEG gelの平衡膨張率を0とした。各PEG gelのエチレンオキシドユニット数と平衡膨張率の相関図を図(2)-84に示す。まず4G-DMAを用いたPEG gelでは架橋剤率が小さい場合，固化しなかった。この原因として4G-DMAは，架橋剤の鎖長が短いため，架橋剤量が少ない場合全体積に占める架橋剤の割合が低く，十分な架橋が進まないことが原因と考えられる。一方で，架橋剤率が大きい場合固化が観察され，平衡膨張率が非常に高かった。しかしながら，非常に壊れやすくゼリー状であったため，その他の評価は困難であった。次に，エチレンオキシドユニットが長い9G-DMAのPEG gelを観察した場合，4G-DMAのPEG gelに比べてゲル化の範囲が広くなる一方，平衡膨張率が低下した。これは，モル量が一定の場合，鎖長が長くなるにつれてPEG gelの全体積に占める架橋剤の体積が大きくなるため，架橋が十分に起こったためだと考えられる。しかしながら，鎖長が長くなるにつれてPEG gel内のイオン性官能基同士の斥力が抑制されると考えられるため，PEG gelの膨張が抑制され平衡膨張率が低下したと考えられる。この傾向は，鎖長が長くなるにつれて顕著になった。



図(2)-84　PEG-DMAの分子量の違いによる平衡膨張率

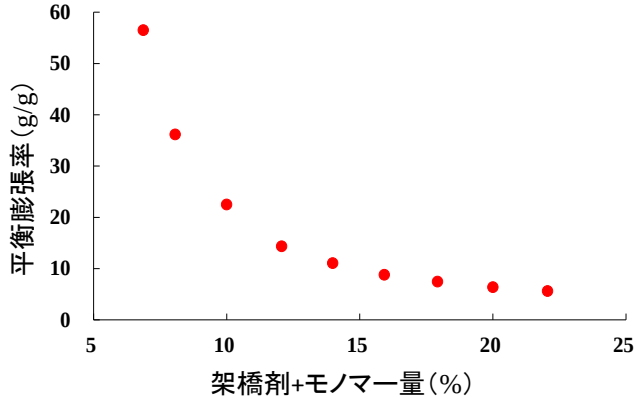
次に，ゲル化の範囲が広い14G-DMA, 23G-DMAの架橋剤率と平衡膨張率の相関を図(2)-85に示す。その結果，架橋剤率が低くなるにつれてPEG gelの平衡膨張率が増加した。これは，架橋度が減少することとイオン性官能基同士の斥力が増加するためだと考えられる。これらの結果から，エチレンオキシドユニット数が小さい場合，体積変化が大きくなるが，PEG gelが非常に壊れやすくなることが示唆され，異なるエチレンオキシドユニット数のPEG-DMAを用いることで，PEG gelの体積変化の制御が可能であることが示唆された。以上の結果から，本検討ではゲル化の範囲が広く，平衡膨張率が大きい14G-DMAを用いて以後の評価を進めた。



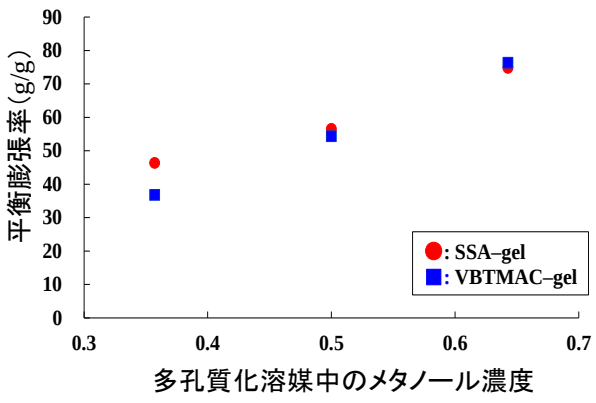
図(2)-85　架橋剤率と平衡膨張率の相関

b. ヒドロゲルの組成の違いによる平衡膨張率の変化　次に，架橋剤の14G-DMAと機能性モノマーのSSAの組成を変えることで，PEG gelの平衡膨張率の変化を観察した。まず，機能性モノマーと架橋剤の組成を70/30（mol/mol）に固定し，全体積に占める架橋剤＋機能性モノマー量を変えた際の平衡膨張率を図(2)-86に示す。その結果，架橋剤＋機能性モノマーの体積比が増加するにつれて平衡膨張率が大きく低下した。これは，PEG gelの架橋度が増加し，弾性が低下したためだと考えられる。また，架橋剤＋機能性モノマーの体積比が6.9%以下の場合，洗浄時の膨張でPEG gelが壊れてしまい，断面積の測定が困難であったため，本検討での最適値を6.9%とした。

さらに，多孔質化溶媒のmethanol濃度を変えた際のPEG gelの平衡膨張率を図(2)-87に示す。その結果，methanol濃度が増加するにつれて平衡膨張率が増加した。これはmethanol濃度が高い場合，PEG gelがmethanol中で安定しようとするため，PEG gel内のイオン性官能基の配列が水の多い場合と異なることが原因と考えられる。この結果から，methanol濃度を変化することによりPEG gelの平衡膨張率を変化させることが可能であることが示唆された。また，methanol濃度が70%以上の場合，PEG gelが壊れやすかったため，本検討での最適値を67%とした。このように，PEG-DMAを架橋剤として用いたPEG gelはPEG-DMAの分子量, 機能性モノマーや多孔質化溶媒の化学的性質に応じて平衡膨張率が大きく変化した。



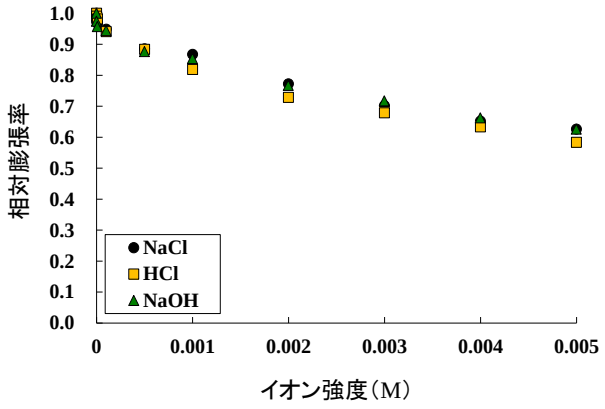
図(2)-86　架橋剤+モノマー量と平衡膨張率の相関



図(2)-87　多孔質化溶媒と平衡膨張率の相関

c．様々な溶媒に対する収縮挙動

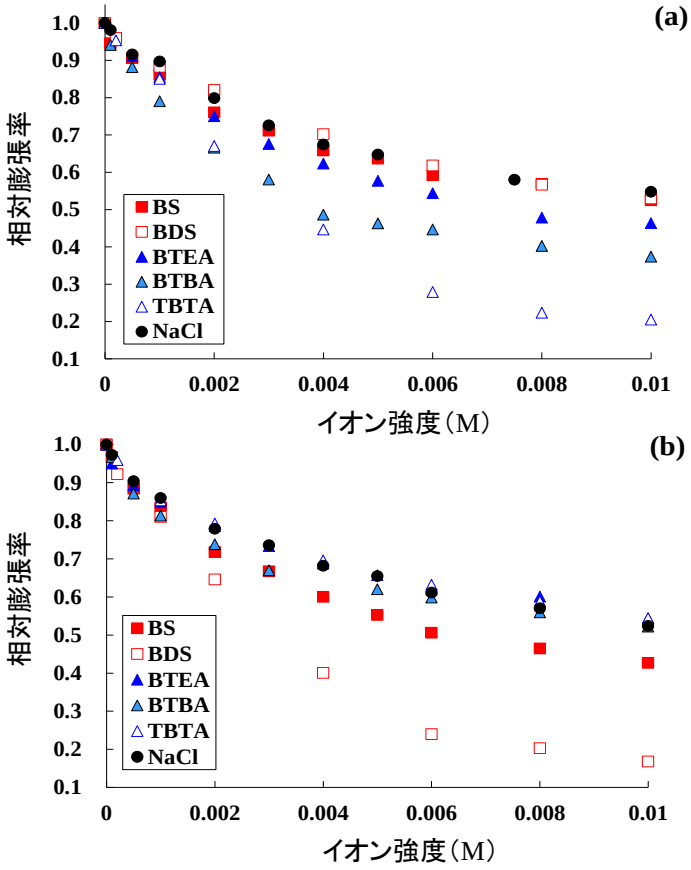
まず，NaCl, HCl, NaOHに対する相対膨張率を評価することで，PEG gelのpHやイオン強度に対する膨潤・収縮挙動を観察した（図(2)-88）。その結果，全ての溶液でイオン強度が増加するに伴ってPEG gelの相対膨張率が低下した。これは，PEG gel骨格中のイオン性官能基が溶液中のイオンと相互作用するため，PEG gel間のイオン性官能基の斥力が抑制されたためだと考えられる。この現象は，カチオンのVBTMACを用いた場合も同様であった。また，全ての溶液に対する相対膨張率は同程度であった。このことから，合成したPEG gelはpHではなく，イオン強度のみに依存して収縮していることを確認できた。これは，スルホ基やアンモニウム基を有する機能性モノマーを用いているため，広範囲のpHで解離しているためだと考えられる。



図(2)-88　塩，酸，塩基に対する相対膨張率

次に，種々のイオン性化合物に対する相対膨張率を評価した（図(2)-89）。はじめに，一官能のイオン性化合物に対する相対膨張率を評価した。その結果，まず，機能性モノマーとしてSSAを用いたアニオンゲルにおいてアニオン性化合物（BS）に対する相対膨張率はNaClと同程度であった。このことから，アニオン性化合物においてはPEG gel間のイオン性官能基の斥力の抑制のみが作用したと考えられる。一方，カチオン性化合物に対する相対膨張率を評価した場合，アニオン性化合物に比べてBTEA, BTBAに対する相対膨張率が低下した。特に，BTBAに対して相対膨張率が大きく低下した。これは，PEG gel間のイオン性官能基の斥力の抑制に加えてスルホ基とアンモニウム基が錯形成することで，PEG gelの疎水性が増加したことが原因と考えられる。実際，エチル基を含むBTEAに比べてブチル基を含むBTBAに対する相対膨張率が低かったため，錯形成が起こっていると予想される。同様に，機能性モノマーとしてVBTMACを用いたカチオンゲルにおいて，NaCl, BTEA, BTBAに対する相対膨張率は同程度であり，BSに対する相対膨張率が低下し，カチオンゲルにおいてもアニオンゲルと同様の現象が起こることを確認できた。次に，一官能と二官能のイオン化合物の相対膨張率の違いを検討した結果，対イオンを含む二官能のイオン性化合物に対する相対膨張率はイオン強度が増加するにつれて非常に低くなった。これは，PEG gelの体積が小さくなるにつれて，PEG gel間のイオン性官能基の距離が短くなり，二官能のイオン性化合物に引き付けられたためだと考えられる。さらに，評価に用いたPEG gelを水に浸漬したところ，アニオンゲルの相対膨張率はBS=97%，BDS=100%，BTEA=92%，BTBA=85%，TBTA=40%であり，二官能のカチオン性化合物ではPEG gelの膨張が抑制された。このことから，二官能のTBTAが擬似

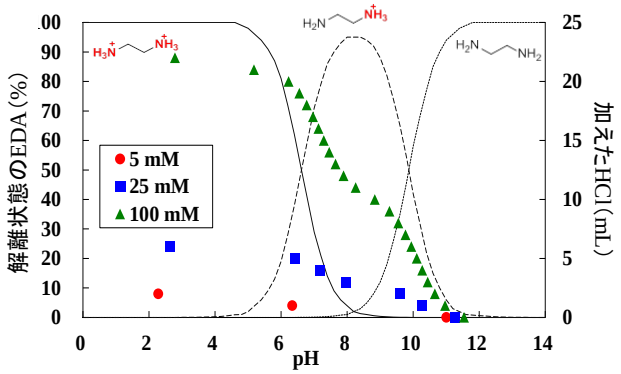
的な架橋点としてPEG gelに強く保持されていることが明らかとなった。また，一度NaCl水溶液で洗浄することで，PEG gelの体積は初期状態に戻ることも確認できた。これらの結果から，PEG gelの架橋剤の長さ，イオン性官能基量など，ターゲット分子に応じてPEG gelの合成条件を変えることで，目的の化合物に対して特異的に収縮するPEG gelの合成が可能であることが示唆された。



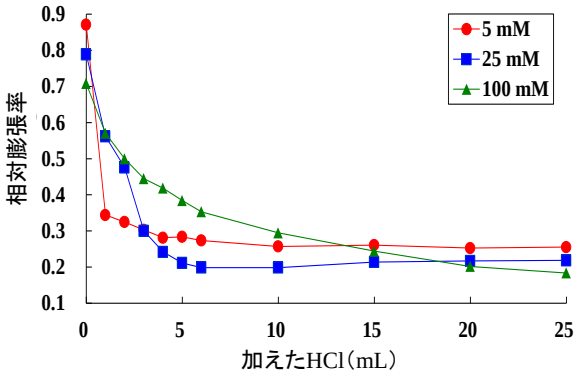
図(2)-89　イオン化合物に対する相対膨張率
(a) SSA–hydrogel, (b) VBTMAC–hydrogel

最後に，溶液のpHの違いにより，アミノ基の解離状態が変化するEDAに対する相対膨張率を評価した。図(2)-90にEDA水溶液のpHとそのpHにおけるEDAの解離状態の割合を示す。また，HClを滴下した時のEDA水溶液のpH変化を各プロットに示す。図(2)-91にPEG gelの相対膨張率の変化を示す。その結果，まず，HClを滴下していない条件においてEDA水溶液の濃度に依存して相対膨張率が低下した。これは，EDAのみの水溶液では一つのアミノ基がわずかに解離した状態であるため，解離したアミノ基量に依存してPEG gelが収縮したと考えられる。次に，HClを加えることによってアミノ基の解離状態を変化させ，相対膨張率の変化を観察した。その結果，まずHCl 1.0 mL加えることによって相対膨張率が大きく変化した。2つのアミノ基が解離することで，上述したようにPEG gel骨格のイオン性官能基がEDAに引き寄せられ，相対膨張率が大きく低下したと考えられる。また，25 mM EDA水溶液においても2つのアミノ基が解離することで相対膨張率が大きく低

下した。さらにHClを加え，全てのEDA水溶液で2つのアミノ基を解離させることによって相対膨張率はEDA水溶液の濃度に依存することが明らかとなった。この結果から，2つのアミノ基の解離を制御することで，PEG gelの体積を制御できる可能性が示唆された。



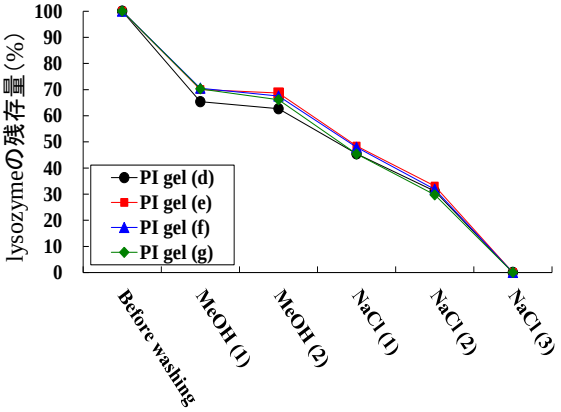
図(2)-90　pHの違いによるEDAの解離状態の変化



図(2)-91　EDAに対するSSA gelの相対膨張率

d. タンパク質をターゲットとしたインプリントゲルの開発

上記までの検討で，PEG gelの種々のイオン性化合物に対する基礎的な膨潤・収縮特性を明らかにすることができた。そこで，PEG gel合成時に鋳型分子としてタンパク質を加えることでPEG gelの膨潤・収縮挙動にどのような変化があるか検討した。本検討では，タンパク質としてlysozymeを用いた。lysozymeは比較的安価であり，安定性も高いタンパク質である。分子量は14,307，等電点は11.1-11.4であり，酸性アミノ酸（Asp7, Glu2）に対して塩基性アミノ酸（Arg11, Lys6）の数が多い塩基性タンパク質である。そのため本検討では，アニオン性の機能性モノマーであるSSAを用いてPI gelを合成した（表(2)-21）。まず，合成したPI gel内のlysozymeが完全に除去できているか検討した。方法は，重合後のPI gelの洗浄溶媒を回収し，溶媒中のlysozymeが検出されなくなるまで，洗浄を繰り返した。Lysozymeの検出は，UV-Vis spectrophotometerを用いた。まず，合成したPI gel内のlysozymeの残存量を算出した結果，全てのPI gelで完全にlysozymeを除去できた（図(2)-92）。そこで，合成したPI gelのlysozymeに対する吸着率およびimprinting factor（IF）を評価した（図(2)-93）。その結果，全ての組成で非常に高いIFが得られた。また，架橋剤量が少なくなるにつれてlysozymeに対する吸着率が増加した。これは，PI gelの弾性が増加することでターゲットタンパク質の構造に応じてPI gelが体積変化したことが原因と考えられる。以上の結果から，組成を検討することで特定のタンパク質を選択的に吸着するPI gelの開発が可能であることが示された。



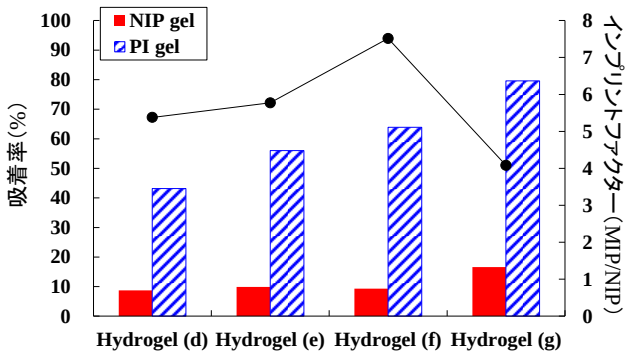
図(2)-92　PI gelsの洗浄回数とlysozyme量

次に，図(2)-93を評価した際の各PI gelの体積変化を図(2)-94に示す。その結果，わずかではあるがPI gelに対して特異的な収縮が観察され，本研究の概念が有効であることが示された。

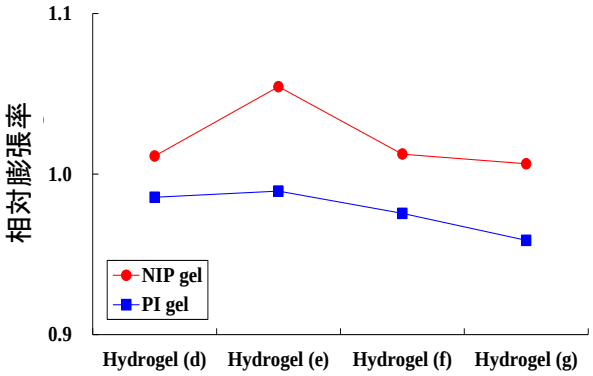
表(2)-21　評価したPI gelの組成.

	Cross–linker/porogen (mL/mL)
14G–PI gel (c)	0.109
14G–PI gel (d)	0.100
14G–PI gel (e)	0.091
14G–PI gel (f)	0.083
14G–PI gel (g)	0.074

合成条件: Porogen, 10% EtOH aq.; Initiator, ADVN 1.0 wt.%; SSA + lysozyme, 6.0 mol/mol; (SSA + lysozyme)/porogen, 0.006 g/mL; polymerization, UV (365 nm 3 h).



図(2)-93　Lysozymeに対する吸着率とIF



図(2)-94　Lysozymeに対する相対膨張率

５．本研究により得られた成果

（１）科学的意義

カラムスイッチングシステムの構築により，これまで長時間と煩雑な手間を要し，再現性の悪い環境水試料中の微量化学物質の定量分析が，極めて簡便に，且つ短時間で精度よく実施できるようになった。また，その手法を一般化，市販化するまでに至り，本研究で得られた成果がすでに社会還元寄与したと言える。さらに，この手法は，環境水以外にも，上水中の規制化学物質の定量分析等への応用も期待できる。

次に，これまで分子インプリント法の適用が困難であったガス状物質，親水性化合物，タンパク質の選択的吸着に成功した。これにより，物理的・化学的性質の異なる種々の環境汚染物質を選択的に吸着できる機能性材料開発の可能性を見出し，効率的な環境汚染物質除去技術開発に貢献した。特に，「疑似分子鋳型」を用いることで，目的物質の効率的な分離濃縮が達成できた。このことから，方法論としての科学的意義は高いと考えられる。また，官能基間距離固定化法は，2つ以上の親水性官能基を有する物質に対して有効であるため，その一般性も高いと判断できる。

また，スポンジモノリスにより，新しい分離選択性や選択的濃縮機能を付与し，同時に通液性を大幅に改善した分離剤を創成した。その特性を利用し，環境分野や生体分野への分析化学的な貢献が期待される。また，スポンジモノリスと機能性のポリマー粒子とのハイブリッド膜は，高通水性を維持したまま粒子の機能を発現することが明らかとなった。この分子鋳型ハイブリッド膜は，高通水性かつ分子選択的な捕捉を可能とする新規分離膜として期待できる。

さらに，PCBやダイオキシン類のような多くの同族体を含む有機塩素化合物について，分子インプリント型固相カラムを用いることで選択的分離精製が可能となった。これまで，同類の研究成果は報告されておらず，さらなる研究の推進によって，本研究で得られた成果がPCB等の分離剤として利用されることが期待できる。

（２）環境政策への貢献

＜行政が既に活用した成果＞

特に記載すべき事項はないが，アプローチを進めている。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

EPAもPPCPの生態系への影響を懸念しており，継続的なモニタリングが今後求められる。その際，分析前処理における定量分析の高効率化は非常に重要であり，本課題の成果が環境モニタリングの低コスト化，自動化に寄与すると期待できるため，今後の環境政策に貢献できると予想される。特に環境水試料の前処理/分析の方法としてポンプ濃縮によるカラムスイッチング分析の公定法，通知法などへの適用が期待できる。つまり，広範囲に応用可能なプラットフォームを提供したことになる。

また，本研究で開発した分子認識技術を利用することで，これまで選択的吸着・分離が困難であった種々の環境汚染物質の定量分析や効率的な除去が可能になると考えられる。さらに，その他の材料との複合化技術を用いることで，工場排水，病院等の排水源で新たな浄化材として環境政策に貢献すると期待できる。

最終総括

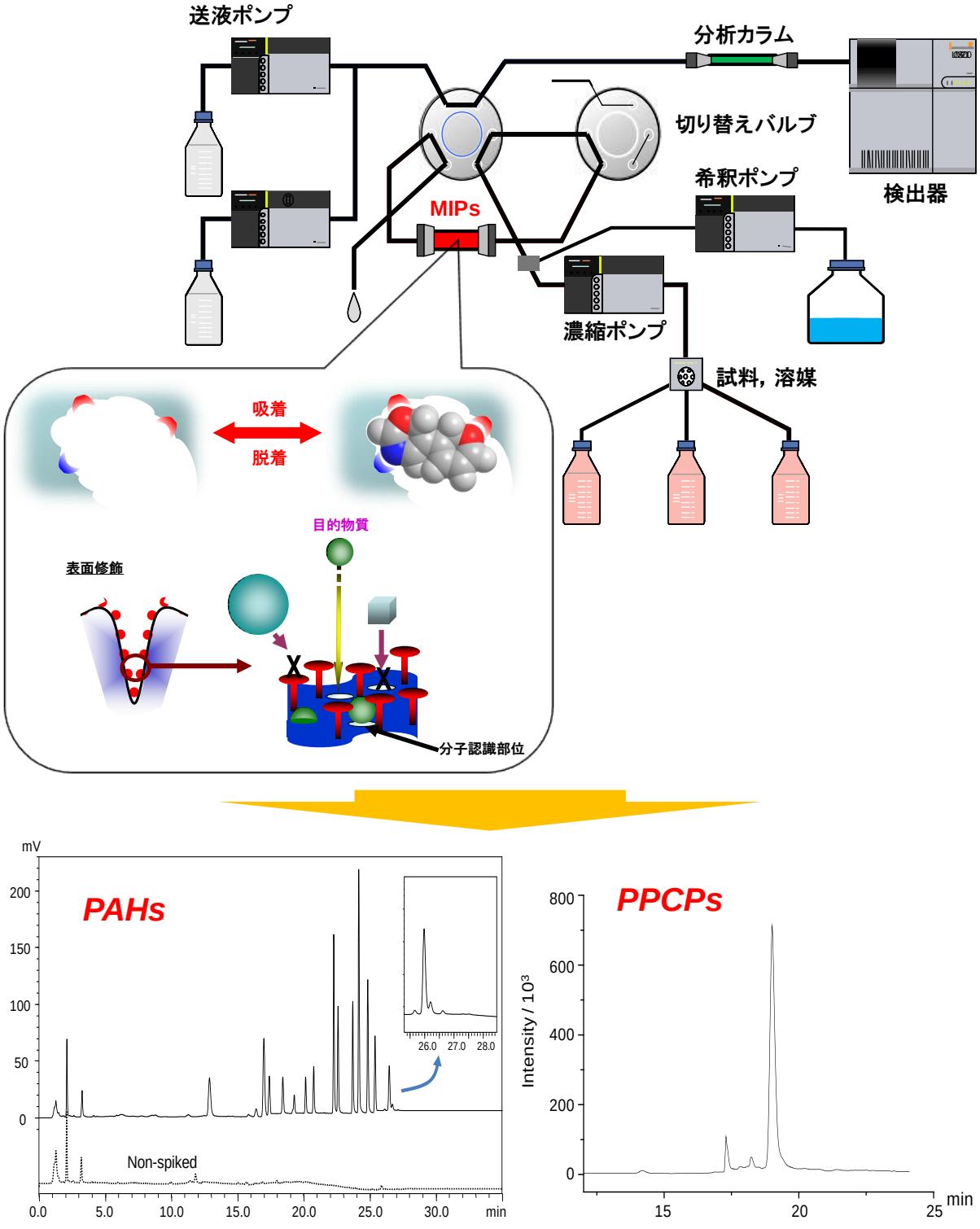
本研究では，（１）高感度分析システム，（２）選択的分離剤の開発を主たる目的として検討を進めてきた。その結果，上記成果報告の通り，双方において革新的な技術開発が達成された。さらに，下図に示すとおり，本研究の各サブテーマは，それぞれを補完的に組み合わせることで，これまで困難とされてきた環境試料中の極微量成分を迅速／簡便／高感度かつ定量的に分析することが可能となった。本研究成果が，今後の環境分析技術に大きく寄与することを期待する。

繰り返しになるが，本研究を総括する上で強調したい点はそれぞれのサブテーマに由来する以下に挙げる2点である。

１．　質量分析計に依存することなく，汎用の検出器を用いて，誰にでも実環境濃度分析に対応できる選択性，並びに分析系を構築したこと。

２．　検討で用いたターゲット分子の数は多くないが，疎水性物質から，超親水性物質まであらゆるターゲット化合物に対しての疑似分子鋳型作製に対する共通の概念を創出したこと。

つまり，今後ますます需要が拡大する「水」「大気」環境における安全確保に関して，一般論として通用する手法・概念を創出したことを強調しておきたい。このような機会を頂戴できたことを再度感謝致したい。



図．本研究から生まれた迅速／簡便／高感度／定量分析のイメージ

６．国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

７．研究成果の発表状況

（１）誌上発表

＜論文（査読あり）＞

1) Selective Adsorption of Water-soluble Ionic Compounds by Interval Immobilization Technique Based on Molecular Imprinting
T. Kubo, Y. Tominaga, F. Watanabe, K. Kaya, K. Hosoya, *Anal. Sci.*, 24, 1633–1636, 2008

2) High Throughput On-line Preconcentration Using ‘‘Spongy-monolith’’ Prepared by Pore Templates
T. Kubo, F. Watanabe, K. Kaya, K. Hosoya, *Chem. Lett.*, 37, 950–951, 2008

3) Effective Determination Method for a Cyanobacterial Neurotoxin, *β-N*-methylamino-L-alanine
T. Kubo, N. Kato, K. Hosoya, K. Kaya, *Toxicon*, 51, 1264–1268, 2008

4) Poly(Glycerin 1,3-Dimethacrylate)-Based Monolith with a Bicontinuous Structure Tailored as HPLC Column by Photoinitiated In Situ Radical Polymerization via Viscoelastic Phase Separation
H. Aoki, N. Tanaka, T. Kubo, K. Hosoya, *J. Polym. Sci. Part A, Polym. Chem.*, 46, 4651–4673, 2008

5) Well-Controlled 3D Skeletal Epoxy-Based Monoliths Obtained by Polymerization Induced Phase Separation
N. Tsujioka, N. Ishizuka, N. Tanaka, T. Kubo, K. Hosoya, *J. Polym. Sci. Part A, Polym. Chem.*, 46, 3272–3281, 2008

6) Properties of Flaky Affinity Resin with Co-continuous Structure
T. Mori, A. Tanaka, T. Kubo, K. Kaya, M. Sakamoto, K. Hosoya, *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 1983–1991, 2008

7) Development and Applications of Fragment Imprinting Technique
T. Kubo, *Chromatography*, 29, 9–17, 2008

8) New Values of Molecular Extinction Coefficient and Specific Rotation for Cyanobacterial Toxin Cylindrospermopsin
T. Sano, S. Kikuchi, T. Kubo, H. Takagi, K. Hosoya, K. Kaya, *Toxicon*, 51, 717–719, 2008

9) A Novel Chip Device Based on Wired Capillary Packed with High Performance Polymerbased Monolith for HPLC: Reproducibility in Preparation Processes to Obtain Long Columns
K. Hosoya, M. Sakamoto, K. Akai, T. Mori, T. Kubo, K. Kaya, K. Okada, N. Tsujioka, N. Tanaka, *Anal. Sci.*, 24, 149–154, 2008

10) Polymer-Based Monolithic Columns in Capillary Format Tailored by Using Controlled in situ Polymerization
H. Aoki, N. Tanaka, T. Kubo, K. Hosoya, *J. Sep. Sci.*, 32, 341–358, 2009

11) Importance of Surface Properties of Affinity Resin for Capturing a Target Protein, Cyclooxygenase-1
T. Mori, T. Kubo, K. Kaya, K. Hosoya, *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 1587–1599, 2009

12) Quantitative evaluations of surface-concentrated amino groups on monolithic-type solid supports prepared by copolymerization method
T. Mori, T. Kubo, K. Kaya, K. Hosoya, *Colloid Polym. Sci.*, 287, 513–523, 2009

13) イシクラゲ (Nostoc commune) およびスイゼンジノリ(Aphanothece sacrum) の神経毒 BMAA (*β*-*N*-methylamino-L-alanine) の分析
竹中裕行，久保拓也，*医学と生物学*，153, 176–179, 2009

14) Effective Recognition on the Surface of a Polymer Prepared by Molecular Imprinting Using Ionic Complex
Y. Tominaga, T. Kubo, K. Kaya, K. Hosoya, *Macromolecules*, 42, 2911–2915, 2009

15) Properties of A Non-Aromatic Epoxy Polymer-Based Monolithic Capillary Column for μ-HPLC
T. Mori, T. Kubo, M. Sakamoto, K. Kaya, K. Hosoya, *Chromatographia*, 70, 699–704, 2009

16) Spontaneous Water Cleanup Using an Epoxy-Based Polymer Monolith
T. Kubo, Y. Tominaga, K. Yasuda, S. Fujii, F. Watanabe, T. Mori, Y. Kakudo, K. Hosoya, *Anal. Methods*, 2, 570–574, 2010

17) Novel Separation Medium Spongy Monolith for High Throughput Analyses
F. Watanabe, T. Kubo, K. Kaya, K. Hosoya, *J. Chromatogr. A*, 1216, 7402–7408, 2009

18) Novel Polymer Monolithic Column for Hydrophilic Compounds
T. Kubo, F. Watanabe, N. Kimura, K. Kaya, K. Hosoya, *Chromatographia*, 70, 527–532, 2009

19) Co-continuous Monolithic Titania Prepared by Organic Polymer Monolith as Pore Template. Material Letters
T. Kubo, N. Tsujioka, N. Tanaka, K. Hosoya, *Mater. Lett.*, 64, 177–80, 2010

20) Bi-Continuous Macroporous Polymer Derived from Oligo-Ethylene oxide Divinyl Ether by a Cationic Polymerization
T. Mori, T. Kubo, K. Hosoya, *Colloid Polym. Sci.*, 288, 1651–1653, 2010

21) Polymers of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine truly work as cell membrane mimic?
T. Mori, T. Kubo, K. Hosoya, *Colloids Surf. B*, 84, 181-186, 2011

22) Surface Modification of TiO2 for Selective Photodegradation of Toxic Compounds
Y. Tominaga, T. Kubo, K. Hosoya, *Catal. Commun.*, 12, 785–789, 2011

23) Comprehensive Study of Proteins that Interact with Microcystin-LR
T. Mori, T. Kubo, K. Kaya, K. Hosoya, *Anal. Bioanal. Chem.*, 402, 1137–1147, 2011

24) Problems and Improvements of the Regulated Analyses Method on GC for Nonyl Phenol Isomers
A. Kobayashi, Y. Kitahara, K. Toyota, S. Suzuki, T. Kubo, K. Hosoya, *Anal. Methods*, 4, 869–872, 2012

25) Synthesis of Novel Polymer Type Sulfoxide Solid Phase Combined with the Porogen Imprinting for Enabling Selective Separation of Polychlorinated Biphenyls
Y. Tominaga, T. Kubo, A. Kobayashi, K. Yasuda, K. Kato, K. Hosoya, *Chemosphere*, 89, 378–382, 2012

26) Development of Molecularly Imprinted Porous Polymers for Selective Adsorption of Gaseous Compounds
Y. Tominaga, T. Kubo, K. Yasuda, K. Kato, K. Hosoya, *Micro. Meso. Mater.*, 156, 161–165, 2012

27) 分子選択的前処理を目的とした分子インプリント法の応用技術開
久保拓也, *分析化学*, 61, 371–381, 2012

28) Specific Chromatographic Retentions on Polymer Pore Surface of Macroporous Spongy Monoliths
T. Tanigawa, T. Kubo, K. Hosoya, *Chem. Lett.*, 41, 1265–1266, 2012

29) Efficient Total Analysis for Bromine Type Flame Retardants by Simple NICI-GC/MS
A. Kobayashi, T. Kubo, T. Sato, Y. Kitahara, S. Amita, M. Mori, S. Suzuki, K. Otsuka, K. Hosoya, *Anal. Methods*, 5, 866–873, 2013

30) Antibacterial Activities Effectuated by Co-continuous Epoxy-based Polymer Materials
T. Kubo, K. Yasuda, Y. Tominaga, K. Otsuka, K. Hosoya, *Colloids Surf. B*, 107, 53–58, 2013

31) Hybridization of Macroporous Sponge and Spherical Microporous Adsorbent for High Throughput Separation of Ionic Solutes
T. Kubo, Y. Tominaga, K .Yasuda, K. Hosoya, K. Otsuka, *Anal. Sci.*, 29, 417–421, 2013

32) Synthesis of poly(ethylene glycol)-based hydrogels and its swelling/shrinking properties responsive for molecular recognitions
Y. Tominaga, T. Kubo, K .Hosoya, K. Otsuka, *J. Polym. Sci. Part A, Polym. Chem.*, in press

＜その他誌上発表（査読なし）＞

著書

1) 図解　最先端イオン交換技術のすべて，第 3 章　鋳型樹脂
久保拓也，細矢憲，工業調査会，2009 年

解説記事

1) 環境分析に寄与する新規分離媒体 ～選択的分離と超高速分析～
久保拓也，産業と環境，2008 年

2) 分子インプリント技術を応用した環境分析技術・浄化材料の開発
久保拓也，月刊ファインケミカルズ【特集】グリーン・サステイナブルケミストリー最前線，2010 年

3) スポンジ状分離剤を用いた環境分析の簡便化と高感度化
久保拓也，LC talk，2013 年

（２）口頭発表（学会等）

*下線は発表者

＜国際学会＞

1) Novel hydrophilic polymer monolith for capillary chromatography
Takuya Kubo, Naomi Kimura, Ken Hosoya, Kunimitsu Kaya, 32th ISCC, Riva Del Garda (Italy), May 2008 (Keynote Lecture)

2) Effective pretreatment for saxitoxins using novel adsorption medium prepared by interval immobilization technique
Takuya Kubo, Yuichi Tominaga, Kunimitsu Kaya, Ken Hosoya, 21st PREP, San Jose (USA), June 2008 (Poster)

3) Effective molecular recognition for ionic compounds by the interval immobilization technique
Takuya Kubo, Yuichi Tominaga, Ken Hosoya, MIP 2008, Kobe (Japan), September 2008 (Oral)

4) Novel hydrophilic polymer monolith for liquid chromatography
Takuya Kubo, Naomi Kimura, Ken Hosoya, EAS 2008, Somerset (USA), November 2008 (Poster)

5) High throughput on-line concentration by novel separation media, named "Spongy-monolith"
Takuya Kubo, Fuminori Watanabe, Ken Hosoya, HPLC2008 Kyoto, Kyoto (Japan), December 2008 (Oral)

6) Selective concentration of water-soluble natural toxins using polymer based materials
Takuya Kubo, Ken Hosoya, 6th WATER DYNAMICS, Sendai (Japan), March 2009 (Poster)

7) Advancement of reactivity between bioactive compounds immobilized on the novel solid phases and target proteins
Tomoko Mori, Takuya Kubo, Ken Hosoya, 10th Tetrahedron Symposium in Organic and Bioorganic Chemistry, Paris (France), June 2009 (Poster)

8) Spontaneous water cleanup phenomenon of polymer-based monoliths having co-continuous structure
Ken Hosoya, Takuya Kubo, Yuichi Tominaga, Tomohisa Saito, Yuzuru Kakudo, Tomoko Mori, 10th Tetrahedron Symposium in Organic and Bioorganic Chemistry, Paris (France), June 2009 (Poster)

9) Development of PEG type monolithic polymer semi-micro columns for HPLC
Tomoko Mori, Takuya Kubo, Ken Hosoya, The 1st FAPS Polymer Congress, Nagoya (Japan), October 2009 (Poster)

10) Selective adsorption and degradation of toxic compounds by organic-inorganic hybrid material
Takuya Kubo, Yuichi Tominaga, Ken Hosoya, The Second French Research Organizations-Tohoku University Joint Workshop on Frontier Materials, Sendai (Japan), December 2009 (Invited Speaker)

11) New monolithic chromatographic materials based on organic polymers
K. Hosoya, FRONTIER-2010, Albi (France), December 2010 (Invited Speaker)

12) Effect of a quasi-biomembrane on affinity resin for capturing proteins
T. Mori, T. Kubo, K. Hosoya, 2010 International chemical congress of pacific basin societies, Hawaii (USA), December 2010 (Poster)

13) Development of molecularly imprinted polymers enabling selective adsorption for gaseous compounds
Y. Tominaga, T. Kubo, K. Hosoya, ICAS2011, Kyoto (Japan), May 2011 (Oral)

14) The basic study of spongy monoliths and its applications
T. Kubo, K. Kato, T. Tanigawa, Y. Watabe, Y. Tanaka, K. Hosoya, ICAS2011, Kyoto (Japan), May 2011 (Invite Speaker)

15) Improvement of adsorption capacity on spongy monolith
K. Kato, T. Kubo, K. Hosoya, ICAS2011, Kyoto (Japan), May 2011 (Poster)

16) Basic study of macroporous spongy monolith on HPLC separation and its application for effective concentration of PAHs
T. Kubo, T. Tanigawa, K. Kato, Y. Watabe, Y. Tanaka, K. Hosoya, HPLC2011, Budapest (Hungary), June 2011 (Poster)

17) Polymer-based photocoupling agent for the efficient immobilization of nanomaterials including nanoparticles and graphene
T. Kubo, M. Yan, IACIS2012, Sendai (Japan), May 2012 (Poster)

18) Mystery of molecular recognition ability on surface of polymer-based macroporous media
T. Tanigawa, T. Kubo, K. Hosoya, IACIS2012, Sendai (Japan), May 2012 (Poster)

19) 'Wa-shi' (Japanese paper) fabrics as adsorbents
K. Hosoya, Y. Ohizumi, Y. Sakai, T. Kubo, SETAC2012, Berlin (Germany), May 2012 (Poster)

20) Investigation of swelling and shrinking properties of polyethylene glycol-based hydrogel and its application to MIP for DDS
Y. Tominaga, T. Kubo, K. Hosoya, K. Otsuka, MIP 2012, Paris (France), August 2012 (Poster)

21) Effective separation and photodegradation of water-soluble toxic compounds by the molecularly imprinted adsorbents
T. Kubo, K. Otsuka, The 6th Shanghai International Symposium on Analytical Chemistry, Shanghai (China), October 2012 (Invited Speaker)

22) High selective separation of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) by the molecularly imprinted polymer adsorbents
T. Kubo, K. Hosoya, K. Otsuka, PITTCON2013, Philadelphia (USA), March 2013 (Poster)

23) Development of novel hydrogels responsive for molecular recognition
Y. Tominaga, T. Kubo, K. Otsuka, K. Hosoya, PITTCON2013, Philadelphia (USA), March 2013 (Poster)

24) Selective preconcentration and determination of a PPCP, sulpiride in river water by an online SPE-LC-MS using a molecularly imprinted adsorbent
T. Kubo, K. Kuroda, K. Hosoya, K. Otsuka, HPLC2013, Amsterdam (Netherlands), June 2013 (scheduled)

＜国内学会＞

1) 分子インプリント法を用いた構造柔軟性化合物の三次元認識
久保拓也，根本耕司，佐野友春，彼谷邦光，細矢憲，第 69 回分析化学討論会，名古屋，2008 年 5 月（口頭）

2) 高速分析に適した新規カラムの開発
久保拓也，渡辺史憲，細矢憲，彼谷邦光，第 15 回クロマトグラフィーシンポジウム，静岡，2008 年 5 月（口頭）

3) 新規親水性ポリマーモノリス型カラムの分離特性評価
木村尚美，久保拓也，彼谷邦光，細矢憲，第 57 回高分子討論会，大阪，2008 年 9 月（口頭）

4) 分子認識材料の開発と環境分析の高効率化への応用
久保拓也，第 11 回機能構造と分析化学シンポジウム，仙台，2009 年 3 月（依頼講演）

5) ハイスループット分離・分析を目指したスポンジ様カラムの開発
久保拓也，渡辺史憲，彼谷邦光，細矢憲，第 70 回分析化学討論会，和歌山，2009 年 5 月（口頭）

6) 高速送液用スポンジ状モノリス型カラムの基礎評価
久保拓也，渡辺史憲，細矢憲，第 16 回クロマトグラフィーシンポジウム，長崎，2009 年 5 月（ポスター）

7) 新規ポリマーモノリスを用いた自発吸水能および吸着特性評価
細矢憲，久保拓也，森朋子，渡辺史憲，冨永雄一，斎藤智久，藤井宗龍，角銅譲，第 16 回クロマトグラフィーシンポジウム，長崎，2009 年 5 月（ポスター）

8) 新規水質保持材の水質保持メカニズムの解明
斎藤智久，渡辺史憲，冨永雄一，藤井宗龍，森朋子，久保拓也，細矢憲，みちのく分析科学シンポジウム 2009，仙台，2009 年 7 月（ポスター）

9) 選択的吸着・分解を可能とするハイブリッド材の開発に関する研究
冨永雄一，久保拓也，細矢憲，みちのく分析科学シンポジウム 2009，仙台，2009 年 7 月（ポスター）

10) PEG 型骨格を有するポリマーモノリスセミミクロカラムの開発
森朋子，久保拓也，細矢憲，みちのく分析科学シンポジウム 2009，仙台，2009 年 7 月（ポスター）

11) イオン性化合物に対して選択的吸着・分解を目的とした光触媒複合体の合成
冨永雄一，久保拓也，細矢憲，平成 21 年度化学系学協会東北大会，郡山（福島），2009 年 9 月（口頭）

12) クリーンな水環境を目指した研究について
安田紘治，斎藤智久，角銅譲，冨永雄一，森朋子，江藤亮輔，加藤啓太，佐々木遼太郎，久保拓也，細矢憲，平成 21 年度化学系教育協議会東北大会，郡山（福島），2009 年 9 月（ポスター）

13) エポキシ系モノリスにおける微細構造と毛管現象による自発的吸水および水質浄化
久保拓也，斎藤智久，冨永雄一，森朋子，角銅譲，細矢憲，日本分析化学会第 58 年会，札幌，2009 年 9 月（口頭）

14) PEG 型骨格を有するポリマーモノリスセミミクロカラムの開発
森朋子，久保拓也，細矢憲，日本分析化学会第 58 年会，札幌，2009 年 9 月（口頭）

15) 選択的吸着・分解機能を有する光触媒複合体の評価
冨永雄一，久保拓也，細矢憲，日本分析化学会第 58 年会，札幌，2009 年 9 月（口頭）

16) スポンジ状モノリスを用いた新規固相抽出剤の開発に関する基礎検討
加藤啓太，久保拓也，細矢憲，第 20 回クロマトグラフィー科学会議，東京，2009 年 11 月（ポスター）

17) イオン性官能基の距離認識による毒性化合物の選択的捕捉と光分解への応用
冨永雄一，久保拓也，細矢憲，第 20 回クロマトグラフィー科学会議，東京，2009 年 11 月（口頭）

18) ポリエチレングリコール（PEG）型ポリマーモノリスカラム
森朋子，久保拓也，細矢憲，第 20 回クロマトグラフィー科学会議，東京，2009 年 11 月（口頭）

19) スポンジモノリスの固相抽出剤への応用
久保拓也，谷川哲也，田中良知，加藤啓太，渡辺史憲，細矢憲，第 20 回クロマトグラフィー科学会議，東京，2009 年 11 月（口頭）

20) 分子インプリント技術を応用した環境分析技術・浄化材料の開発
久保拓也，渡部悦幸，細矢憲，第 10 回グリーン・サステイナブルケミストリー（GSC）シンポジウム，東京，2010 年 3 月（ポスター）

21) 擬似細胞膜を導入したアフィニティ樹脂による標的タンパク質捕捉の検討
森朋子，久保拓也，細矢憲，第 71 回分析化学討論会，松江，2010 年 5 月（口頭）

22) 光触媒への分子認識部位の導入と水質保全への応用
冨永雄一，久保拓也，細矢憲，第 17 回クロマトグラフィーシンポジウム，広島，2010 年 6 月（口頭）

23) 新着想スポンジモノリスの開発と分析前処理への応用
久保拓也，日本分析化学会第 59 年会，仙台，2010 年 9 月（依頼講演）

24) みぢかな水環境のための高分子多孔質体の開発
細矢憲，第 21 回クロマトグラフィー科学会議，西宮，2010 年 10 月（招待講演）

25) アフィニティ樹脂を用いたミクロシスチンに対する標的タンパク質の検索
森朋子，久保拓也，細矢憲，第 21 回クロマトグラフィー科学会議，西宮，2010 年 10 月（口頭）

26) ガス状物質に対するインプリントポリマーの開発
冨永雄一，久保拓也，細矢　憲，第 21 回クロマトグラフィー科学会議，西宮，2010 年 10 月（口頭）

27) ハイブリット型ウレタンポリマーの基礎検討
安田紘治，加藤啓太，浪岡安行，冨永雄一，森朋子，久保拓也，細矢憲，第 21 回クロマトグラフィー科学会，西宮，2010 年 10 月（ポスター）

28) 抗菌効果を有する新規高分子多孔質体の開発
安田紘治，久保拓也，細矢憲，資源・素材学会東北支部秋季大会，仙台，2010 年 11 月（口頭）

29) Spongy monolith の吸着容量向上に関する研究
加藤啓太，久保拓也，細矢憲，資源・素材学会東北支部秋季大会，仙台，2010 年 11 月（口頭）

30) 様々な方法でホスホリルコリン基を導入したアフィニティ樹脂のタンパク質捕捉特性
森朋子，久保拓也，細矢憲，第 19 回ポリマー材料フォーラム，名古屋，2010 年 12 月（ポスター）

31) 高分子多孔質体の開発
細矢憲，安田紘治，森朋子，加藤啓太，浪岡安行，蛭子貴文，白井文祥，久保拓也，第 19 回ポリマー材料フォーラム，名古屋，2010 年 12 月（ポスター）

32) PCB 類の選択的捕捉を目的とした新規スルホキシド固定相の開発
冨永雄一，小林厚，久保拓也，細矢憲，第 18 回クロマトグラフィーシンポジウム，福岡，2011 年 5 月（口頭）

33) 粒子含有型スポンジモノリスの開発と吸着容量向上へ向けた基礎検討
安田紘治，加藤啓太，冨永雄一，久保拓也，細矢憲，第 18 回クロマトグラフィーシンポジウム，福岡，2011 年 5 月（ポスター）

34) 分子インプリント法を用いた親水性化合物に対する分析前処理剤の開発
久保拓也，日本分析化学会第 60 年会，名古屋，2011 年 9 月（受賞講演）

35) 粒子含有型スポンジモノリスの開発
安田紘治，加藤啓太，冨永雄一，久保拓也，細矢憲，日本分析化学会第 60 年会，名古屋，2011 年 9 月（口頭）

36) 抗菌性を有する新規多孔性高分子の開発
安田紘治，久保拓也，細矢憲，第 33 回日本バイオマテリアル学会大会，京都，2011 年 11 月（口頭）

37) ガス状物質にターゲットとした分子インプリントポリマーの開発
冨永雄一，久保拓也，細矢憲，第 22 回クロマトグラフィー科学会議，仙台，2011 年 11 月（ポスター）

38) 機能性粒子とスポンジモノリスのハイブリット化
安田紘治，久保拓也，細矢憲，第 22 回クロマトグラフィー科学会議，仙台，2011 年 11 月（ポスター）

39) イオン交換基を導入した spongy monolith の合成と評価
安田紘治，久保拓也，細矢憲，第 22 回クロマトグラフィー科学会議，仙台，2011 年 11 月（ポスター）

40) スポンジモノリスカラムの保持特性及び環境水中の多環芳香族化合物濃縮の試み
谷川哲也，加藤啓太，久保拓也，渡部悦幸，細矢憲，第 22 回クロマトグラフィー科学会議，仙台，2011 年 11 月（ポスター）

41) ポリエチレン-ポリ酢酸ビニル混合物（EVA）スポンジモノリスカラムの保持特性評価
谷川哲也，加藤啓太，久保拓也，細矢憲，第 19 回クロマトグラフィーシンポジウム，東京，2012 年 5 月（ポスター）

42) 官能基間距離認識を利用した親水性化合物の選択的な捕捉
安田紘治，久保拓也，細矢憲，大塚浩二，第 19 回クロマトグラフィーシンポジウム，東京，2012 年 5 月（ポスター）

43) 多層型親水性ハイブリッドポリマー充てん剤の調製とその基本特性
伊藤晴香，久保拓也，細矢憲，第 19 回クロマトグラフィーシンポジウム，東京，2012 年 5 月（ポスター）

44) 有機ハロゲン化合物への GC/MS/CI 法の適用
佐藤智行，北原祐輔，小林厚，佐藤信俊，鈴木滋，松宏，第 21 回環境化学討論会，松山，2012 年 7 月（口頭）

45) 分子認識材料の開発と分離・分析への応用～生体応用を夢見て？～
久保拓也，ぶんせき秘帖～巻ノ六～，交野（大阪），2012 年 8 月（依頼講演）

46) 高通水性多孔膜－粒子ハイブリッド材料を用いた高速分析前処理剤の開発
久保拓也，細矢憲，大塚浩二，日本分析化学会第 61 年会，金沢，2012 年 9 月（口頭）

47) 分子刺激応答性ヒドロゲルを用いた水溶性化合物の選択的捕捉
冨永雄一，久保拓也，細矢憲，大塚浩二，日本分析化学会第 61 年会，金沢，2012 年 9 月（口頭）

48) ナノマテリアル固定化基板の創成
久保拓也，Mingdi Yan，大塚浩二，第 56 回日本学術会議材料工学連合講演会，京都，2012 年 10 月（口頭）

49) 分離剤設計のためのマテリアルデザインと表面化学
久保拓也，第 32 回キャピラリー電気泳動シンポジウム，池田（大阪），2012 年 11 月（依頼講演）

50) 高速水前処理を目的としたミクロポーラス粒子ハイブリッド型スポンジ材料の開発
久保拓也，谷川哲也，細矢憲，第 21 回ポリマー材料フォーラム，小倉，2012 年 11 月（ポスター）

51) 分子認識刺激応答・伸縮性ヒドロゲルの開発
久保拓也，冨永雄一，細矢憲，大塚浩二，第 21 回ポリマー材料フォーラム，小倉，2012 年 11 月（ポスター）

52) 機能性高分子多孔体の開発とクロマトグラフィー分析の簡便化
細矢憲，第 23 回クロマトグラフィー科学会議，岐阜，2012 年 11 月（受賞講演）

53) 油中 PCB の選択的分離を目的としたスルホキシド含有型分子インプリント固相剤の開発
小林厚，冨永雄一，久保拓也，細矢憲，第 23 回クロマトグラフィー科学会議，岐阜，2012 年 11 月（口頭）

54) スポンジモノリスの保持特性及び機能化の検討
谷川哲也，久保拓也，細矢憲，第 23 回クロマトグラフィー科学会議，岐阜，2012 年 11 月（口頭）

55) PEG 系ヒドロゲルの分子認識刺激に基づく膨潤・収縮挙動の基礎評価
冨永雄一，久保拓也，末吉健志，細矢憲，大塚浩二，第 23 回クロマトグラフィー科学会議，岐阜，2012 年 11 月（口頭）

56) 親水性ハイブリッドポリマーの調製と評価
伊藤晴香，谷川哲也，久保拓也，細矢憲，第 23 回クロマトグラフィー科学会議，岐阜，2012 年 11 月（ポスター）

57) 残留医薬品の分析前処理を目的とした分子インプリントポリマーの開発
久保拓也，黒田健太，細矢憲，大塚浩二，第 73 回分析化学討論会，北海道，2013 年 5 月（予定）

58) 2．オンライン SPE-LC-MS を用いた環境中残留医薬品の高選択／高感度分析
久保拓也，黒田健太，細矢憲，大塚浩二，第 20 回クロマトグラフィーシンポジウム，兵庫，2013 年 6 月（予定）

（４）シンポジウム，セミナーの開催（主催のもの）

1) Nano Tech 2009-国際ナノテクノロジー総合展・技術会議，東京（ビッグサイト），2009 年 2 月

2) Nano Tech 2010-国際ナノテクノロジー総合展・技術会議，東京（ビッグサイト），2010 年 2 月

3) 第 4 回 SSH（スーパーサイエンスハイスクール）講演会「高分子多孔質体に関する講義と実習」，仙台（宮城県仙台第三高等学校），2011 年 2 月

4) 環境省環境研究総合推進費「擬似分子鋳型を用いた環境汚染物質の選択的捕捉技術の開発」公開シンポジウム，京都（島津製作所），2012 年 1 月

（５）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

（６）その他

1) みちのく分析科学シンポジウム 2009，ベストポスター賞
森朋子，久保拓也，細矢憲，日本分析化学会東北支部，2009 年 7 月

2) 第 20 回クロマトグラフィー科学会議，優秀講演賞
久保拓也，クロマトグラフィー科学会，2009 年 11 月

3) 2009 年度東北分析科学奨励賞
森朋子，日本分析化学会東北支部，2009 年 12 月

4) 第 6 回 GSC ポスター賞
久保拓也，渡部悦幸，細矢憲，GSC ネットワーク，2010 年 3 月

5) 日本分析化学会 2011 年度奨励賞
久保拓也，日本分析化学会，2011 年 9 月

6) クロマトグラフィー科学会 2012 年度学会賞
細矢憲，クロマトグラフィー科学会，2012 年 11 月

８．引用文献

1) 抗インフルエンザウイルス剤の河川環境への流出
H. Tanaka, *Farumashia*, vol. 46 (7), 664–668, 2010

2) Modern Extraction Techniques
D.E Raynie, *Anal. Chem.*, 76, 4659–4664, 2004

3) Monosized stationary phases for chromatography
T. Ellingsen, O. Aune, J. Ugelstad, S. Hagen, *J. Chromatogr.*, 535, 147–161, 1990

4) Peer Reviewed, Monolithic LC Columns
N. Tanaka, H. Kobayashi, K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Ishizuka, *Anal. Chem.*, *73*, 420–29, 2001

5) Recent developments in the field of monolithic stationary phases for capillary electrochromatography
F. Svec, *J. Sep. Sci.*, 28, 729–745, 2005

6) High-Performance Polymer-Based Monolithic Capillary Column
K. Hosoya, N. Hira, K. Yamamoto, M. Nishimura, N. Tanaka, *Anal. Chem.*, 78, 5729-5735, 2006

7) Controlled pore formation in organotrialkoxysilane-derived hybrids, from aerogels to hierarchically porous monoliths
K. Kanamori, K. Nakanishi, *Chem. Soc. Rev.*, 40, 754–770, 2011

8) Novel separation medium spongy monolith for high throughput analyses
F. Watanabe, T. Kubo, K. Kaya, K. Hosoya, *J. Chromatogr. A*, 1216, 7402–7408, 2009

9) Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase
A. Poland, E.Glover, A.S. Kend, *J. Biol. Chem.*, 251, 4936–4946, 1976

10) An overview of toxins and genes from the venom of the asian scorpion Buthus martensi Karsch
C. Goudet, C,W. Chi, J. Tytgat, *Toxicon.*, 40, 1239–1258, 2002

11) Botulinumtoxin, Vom Gift zum Medikament Ein historischer Rückblick
O.P. Kreyden, M.L. Geiges, R. Boni, G. Burg, *Hautarzt.*, 51, 733–737, 2000

12) Preparation of chromatographic sorbents with chiral cavities for racemic resolution
G. Wulff, W. Vesper, *J. Chromatogr. A*, 167, 171–186, 1978

13) Separation of amino acids, peptides and proteins on molecularly imprinted stationary phases
M. Kempe, K. Mosbach, *J. Chromatogr. A*, 691, 317–323, 1995

14) Occurrence of 70 pharmaceutical and personal care products in Tone River basin in Japan
N. Nakada, K. Komori, Y. Suzuki, C. Konishi, I. Houwa, H. Tanaka, *Water Sci. Technol.*, 56, 133–140, 2007

15) Pharmaceuticals and personal care products in the environment, what are the big questions?
A.B. Boxall, M.A. Rudd, B.W. Brooks, D.J. Caldwell, K. Choi, S. Hickmann, E. Innes, K. Ostapyk, J.P. Staveley, T. Verslycke, *Environ. Health Perspect.*, 120, 1221–1229, 2012

16) Comment on “Feather Meal, A Previously Unrecognized Route for Reentry into the Food Supply of Multiple Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs)”
B.J. Kelly, *Environ. Sci. Technol.*, 46, 13024–13025, 2012

17) Feather meal, A previously unrecognized route for reentry into the food supply of multiple pharmaceuticals and personal care products (PPCPs)
D. Love, R. Halden, M. Davis, K. Nachman, *Environ. Sci. Technol*., 46, 3795–3802, 2012

18) Overview of passive Chemcatcher sampling with SPE pretreatment suitable for the analysis of NPEOs and NPs
H. Ahkola, S. Herve, J. Knuutinen, *Environ. Sci. Pollut. R.*, 20, 1207–1218, 2013

19) Occurrence and removal of pharmaceutical and hormone contaminants in rural wastewater treatment lagoons
X. Li, W. Zheng, W.R. Kelly, *Sci. Total Environ.*, 445, 22–28, 2013

20) Less common applications of monoliths, Preconcentration and solid-phase extraction
F. Svec, *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl*., 841, 52–64, 2006

21) Extraction and clean-up strategies for the analysis of poly- and perfluoroalkyl substances in environmental and human matrices
S.P.J. van Leeuwen, J. de Boer, *J. Chromatogr. A*, 1153, 172–185, 2007

22) Analysis of industrial contaminants in indoor air, Part 1. Volatile organic compounds, carbonyl compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls
R. Barro, J. Regueiro, M. Llompart, C. Garcia-Jares, *J. Chromatogr. A*, 1216, 540–566, 2009

23) Analysis of industrial contaminants in indoor air. Part 2. Emergent contaminants and pesticides
C. Garcia-Jares, J. Regueiro, R. Barro, T. Dagnac, M. Llompart, *J. Chromatogr. A*, 1216, 567–597, 2009

24) Novel separation medium spongy monolith for high throughput analyses
F. Watanabe, T. Kubo, K. Kaya, K. Hosoya, *J. Chromatogr. A*, 1216, 7402–7408, 2009

25) Retention properties of macroporous spongy monolith and its application for concentration of polyaromatic hydrocarbons
T. Tanigawa, K. Kato, Y. Watabe, T. Kubo, K. Hosoya, *J. Sep. Sci.*, 34, 2193–2198, 2011

26) Specific Chromatographic Retentions on Polymer Pore Surface of Macroporous Spongy Monoliths
T. Tanigawa, T. Kubo, K. Hosoya, *Chem. Lett.*, 41, 1265–1266, 2012

27) Effective recognition on the surface of a polymer prepared by molecular imprinting using ionic complex
Y. Tominaga, T. Kubo, K. Kaya, K. Hosoya, *Macromolecules*, 42, 2911–2915, 2009

28) Surface modification of TiO2 for selective photodegradation of toxic compounds
Y. Tominaga, T. Kubo, K. Hosoya, *Catal. Commun.*, 12, 785–789, 2011

29) LC/MS determination of bisphenol A in river water using a surface-modified molecularly-imprinted polymer as an on-line pretreatment device
Y. Watabe, K. Hosoya, N. Tanaka, T. Kondo, M. Morita, T. Kubo, *Aanl. Bioanal. Chem.*, 381, 1193–1198, 2005

30) Fully automated liquid chromatography-mass spectrometry determination of 17 beta-estradiol in river water
Y. Watabe, T. Kubo, T. Nishikawa, T. Fujita, K. Kaya, K. Hosoya, *J. Chromatogr. A*, 1120, 252–259, 2006

31) Trace level determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in river water with automated pretreatment HPLC
Y. Watabe, T. Kubo, T. Tanigawa, Y. Hayakawa, K. Otsuka, K. Hosoya, *J. Sep. Sci.*, 36, 1128–1134, 2013

32) Sulpiride and headache syndromes
D. De Maio, L. Valzelli, G. Scieghi, *Psychopathology*, 12, 202–208, 2010

33) Development and validation of stability indicating HPLC and HPTLC methods for determination of sulpiride and mebeverine hydrochloride in combination
I.A. Naguib, M. Abdelkawy, *European journal of medicinal chemistry*, 45, 3719–3725, 2010

34) Differential response of A 68930 and sulpiride in stress-induced gastric ulcers in rats
N. Rasheed, A. Ahmad, N. Singh, P. Singh, V. Mishra, N. Banu, M. Lohani, S. Sharma, G. Palit, *Eur. J. Pharmacol.*, 643, 121–128, 2010

35) Determination of sulpiride in pharmaceutical preparations and biological fluids using a Cr (III) enhanced chemiluminescence method
M.N. Khan, M.R. Jan, J. Shah, S.H. Lee, Y.H. Kim, *Luminescence*, 2012

36) Detection, occurrence and fate of 22 psychiatric pharmaceuticals in psychiatric hospital and municipal wastewater treatment plants in Beijing, China
S. Yuan, X. Jiang, X. Xia, H. Zhang, S. Zheng, *Chemosphere*, 90, 2520–2525, 2012

37) Chromatographic Characterization of Silica C18 Packing Materials. Correlation between a Preparation Method and Retention Behavior of Stationary Phase
K. Kimata, K. Iwaguchi, S Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Araki, N. Tanaka, *J. Chromatogr. Sci.*, 27, 721–728, 1989

38) 低濃度PCB簡易測定法マニュアル（第3版），環境省平成23年5月

39) Selective retention of some polyaromatic hydrocarbons by highly crosslinked polymer networks
K. Hosoya, H. Aoki, T. Kubo, M, Teramachi, N Tanaka, J Haginaka, *J. Polym. Sci. Part A, Polym. Chem.*, 43, 2556–2566, 2005

40) Affinity chromatography
G.R. Gray, *Anal. Chem.*, 1980, 52, 9–15, 1980

41) Effect of the direction of ester linkage on molecular shape selectivity through multiple carbonyl—π interaction with octadecyl chain branched polymers as organic phases in reversed-phase high-performance liquid chromatography
A.A. Rana, M. Takafuji, H. Ihara, *J. Chromatogr. A*, 1216, 7440–7445, 2009

Development of Selective Removal Technique of Environmental Pollutants Using Template Molecule Mimics

Principal Investigator: Ken HOSOYA
Institution: Kyoto Prefectural University
1-5 Hangi-cho, Shimogamo, Sakyo-ku,
Kyoto 606-8522, Japan
Tel: +81-75-703-5444 / Fax: +81-75-703-5444
E-mail: hosoya@kpu.ac.jp
Cooperated by: Kyoto University, Shimadzu Corporation, Kaneka Corporation

[Abstract]

Key Words: Column switching, Auto-concentration, Environmental chemicals, Instrumental technology, High performance liquid chromatography, Molecular imprinting, Interval immobilization technique, Poly chlorinated biphenyl, Pharmaceutical and personal care products, Spongy monolith

In this study, to develop a selective/simple analysis and removal technology of environmental pollutants, we studied along two subthemes, (1) Practical application for high sensitive analytical system, and (2) Development and practical application of separation membrane having selective adsorption ability. Especially, compounds such as halogenated aromatics such as poly chlorinated biphenyl (PCBs), polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs), and highly hydrophilic compounds including pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), were considered as the target compounds. The molecularly imprinted media that enable the selective adsorption for these targets were developed. Also, we utilized these media for the sensitive analytical system and the removal technology.

In the study (1), we developed multi-valve column switching HPLC system with a specially designed pretreatment column, and achieved the commercialization of the product. In the trace level analyses of environmental samples, we confirmed trustable repeatability and sensitivity even with general detectors such as a photo diode array and fluorescence detector. The system allowed the simple, versatile, and reliable quantitative analyses of chemical substances in environmental water. The subtheme (1) was performed by cooperation with Kyoto University and SHIMADZU CORPORATION.

In the study of (2), we developed two-type molecularly imprinted media for the organic compounds and highly hydrophilic compounds, which are hard to be separated

and concentrated. As the media for the organic compounds, we aimed to separate PAHs including benzo[a]pyrene, and PCB. For similar objective, we also developed novel spongy monolith which has macroporous structure and consisted of poly (ethylene-co-vinyl acetate). Secondly, for the highly hydrophilic compounds, we aimed to develop the media for a shellfish poison (saxitoxin), a medicine (sulpiride), and a protein (lysozyme). As the selective separation/concentration media for these hydrophilic compounds, we established the interval immobilization technique. The subtheme (2) was performed by cooperation with Kyoto University and KANEKA CORPORATION.

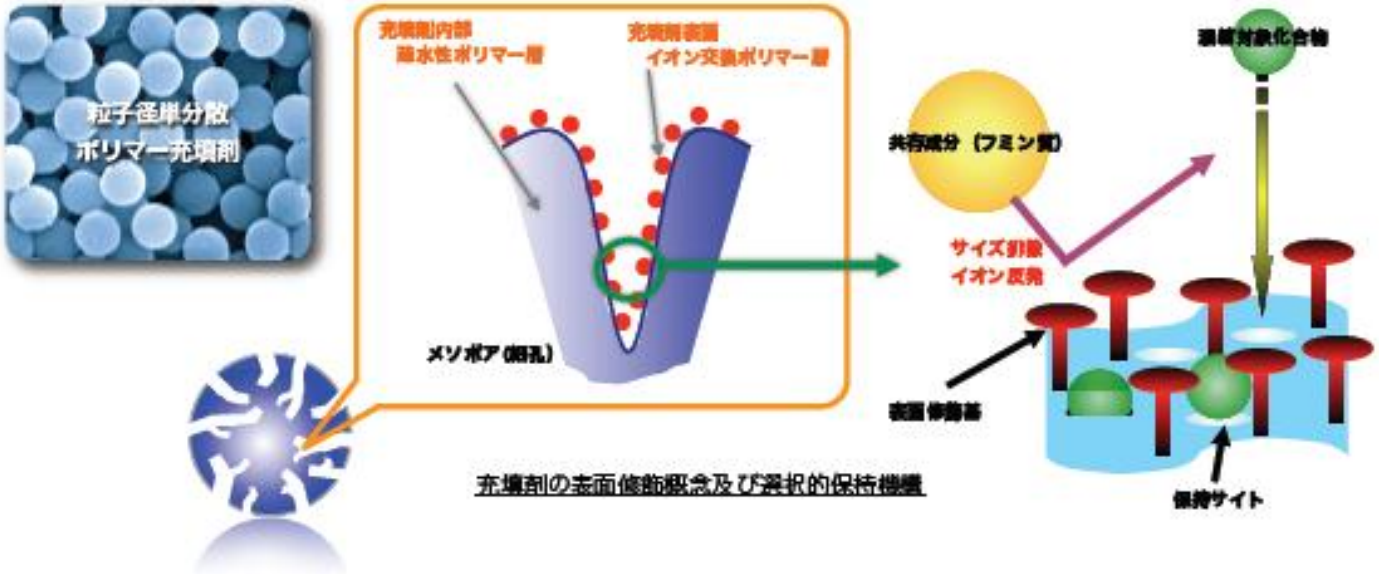
Finally, as the accomplishment of study (1) and (2), we applied the column switching HPLC system for the analysis of real environmental samples to determine PAHs and sulpiride. As a result of analysis for PAHs, 15 ingredients of PAHs were determined at ng/L levels with excellent repeatability and sensitivity. Similarly, as a result of the analysis for sulpiride, we successfully achieved the determination of sulpiride from river water sample by an online SPE-HPLC-MS system with the separation medium prepared by the interval immobilization technique. These applications promise that our results will be applicable for the simple quantitative analyses and removal technologies of the environmental pollutants.

カラムスィッチング用・高選択性前処理カラム

CHEMCO MASK-ENV

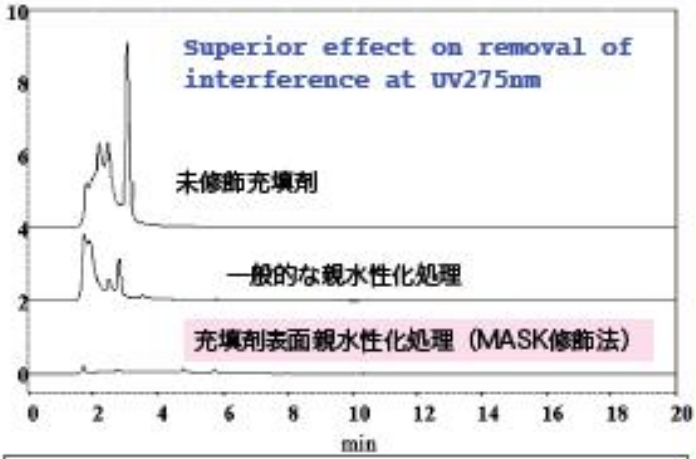
CHEMCO MASK-ENV カラムは環境分析における前処理用に開発された高選択性前処理カラムです。粒子径単分散ポリマー充填剤の表面のみに親水性官能基（スルホン酸）を導入し（MASK修飾法）、分析目的物の濃縮と妨害成分のクリーンアップが効率よく行えます。

従来困難であった環境水試料中に存在するフミン質等の妨害成分はイオン反発により除去され、分析対象物質（フェノール系環境汚染物質）はカラムに選択的に保持されます。
特にLC- MSを用いたカラムスィッチングシステムに組み込むことで、超高感度分析が実現します。※ 本製品は環境ナノテクプロジェクトにおいて京都府立大学・細矢教授により開発された技術を利用した製品です。



充填剤の表面修飾概念及び選択的保持機構

◆ 優れた妨害成分除去効果と選択性



Analytical conditions
Column: Shim-pack VP-ODS (150 x 2.0 mmI.D.)
Pretreatment column CHEMCO MASK-ENV
Mobile phase : water/acetonitrile Gradient Elution
Flow rate : 0.2 mL/min, Temp. : 40 ℃, Detection : UV 275 nm

【図1】妨害成分の除去効果の比較

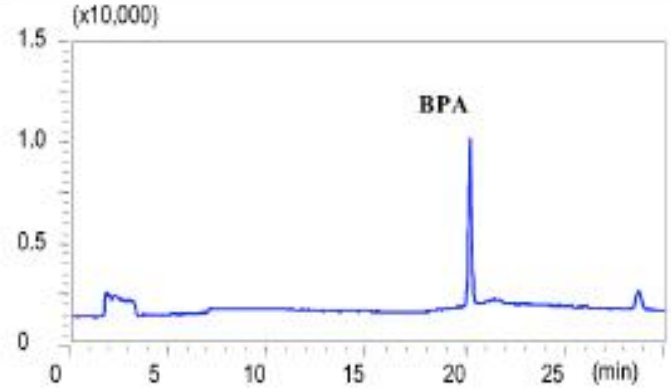
CHEMCO MASK-ENVカラムではMASK修飾法を採用したポリマー充填剤が高感度分析における重要な役目を果たしています。粒度分布の狭いポリマー充填剤により、前処理カラムは良好な通液性と高い送液安定性を保有しています。

充填剤表面に導入された親水性官能基はフミン質等の負電荷を持つ高分子成分をイオン反発により効率よく除去し、分析対象物（フェノール系環境汚染物質）を選択的に吸着・保持します。

図１は種類の異なる分離メディアを前処理カラムとして評価した結果です。MASK修飾法を採用した充填剤は妨害成分を効率よく取り除き、高いクリーンアップ効果を示し、高感度分析の実現に有効です。

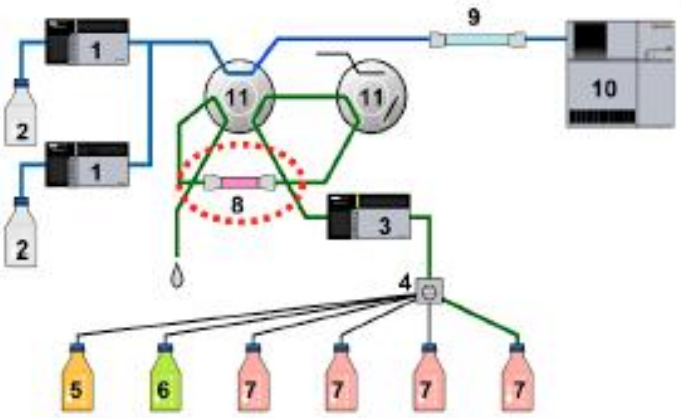
Chemco

◆ 超高感度分析の実現



Analytical conditions
Column: Shim-pack VP-ODS (150 x 2.0 mmI.D.)
Pretreatment column CHEMCO MASK-ENV
Mobile phase : water/acetonitrile Gradient Elution
Flow rate : 0.2 mL/min, Temp. : 40 ℃, Detection : MS (-) 227 m/z, SIM

【図2】ビスフェノール-Aの高感度分析例



1.移動相送液ポンプ、2.移動相、3.試料送液ポンプ、4.低圧切換バルブ、5-7、河川水試料、洗浄液他、8.前処理カラム、9.分析カラム、10.LC-MS

【図3】高感度カラムスィッチングシステム・(株)島津製作所製

図2は濃縮用カラムとしてCHEMCO MASK-ENVカラムを用い、カラムスィッチングにより環境水中のビスフェノール-Aを分析したクロマトグラムです。本システムでは多くの妨害成分を含む実試料中のビスフェノール-Aを高感度(5 ng/L相当)で測定可能でした。システムの検出限界は実試料で0.6 ng/L相当であり、測定の再現性も良好でした（5.4% RSD, n=5）。

※図3に示す高感度カラムスィッチングシステムは(株)島津製作所様により開発され、図1、図2の測定データは全て同社からご提供いただきました。

参考文献　1) 渡部、小倉、藤田、細矢、久保、彼谷　BUNSEKI KAGAKU Vol. 58, No4, pp. 293-299 (2009)
2) Y. Watabe, T. Kubo, T. Nishikawa, T. Fujita, K. Kaya, K. Hosoya. J. Chromatogr. A, 1120 (2006) 252–259

価格表−1：　CHEMCO MASK-ENV ※：その他のサイズはお問い合わせ下さい。

Cat No.	表面修飾基	ベースポリマー	粒子径	カラムサイズ	価　格	備　考
en-410	スルホン酸	ポリメタクリレート	5 um	4 mm i.d x 10 mm L	￥53,000	Mask処理
en-430	スルホン酸	ポリメタクリレート	5 um	4 mm i.d x 30 mm L	￥53,000	Mask処理
en-210	スルホン酸	ポリメタクリレート	5 um	2 mm i.d x 10 mm L	￥53,000	Mask処理
en-230	スルホン酸	ポリメタクリレート	5 um	2 mm i.d x 30 mm L	￥53,000	Mask処理

価格表−2：　疎水性ポリマー充填剤、　一般濃縮前処理・ガードカラム用 ※：その他のサイズはお問い合わせ下さい。

Cat No.	表面修飾基	ベースポリマー	粒子径	カラムサイズ	価　格	備　考
mdp-410	----	ポリメタクリレート	5 um	4 mm i.d x 10 mm L	￥37,000	基材疎水性ゲル
mdp-430	----	ポリメタクリレート	5 um	4 mm i.d x 30 mm L	￥37,000	基材疎水性ゲル
mdp-210	----	ポリメタクリレート	5 um	2 mm i.d x 10 mm L	￥37,000	基材疎水性ゲル
mdp-230	----	ポリメタクリレート	5 um	2 mm i.d x 30 mm L	￥37,000	基材疎水性ゲル

株式会社 ケムコプラス

URL : http://www.chemcoplus.co.jp/
e-mail : info@chemcoplus.co.jp

大阪本社　〒577-0065　大阪府東大阪市高井田中3-10-7
TEL (06)6787-5551(代)　FAX (06)6787-6688
東京営業所　〒108-0074　東京都港区高輪2-19-17-701
TEL (03)3444-4201(代)　FAX (03)3444-4238

PDA検出器を用いた構成例

品名	型名	部品番号	数量
システムコントローラ	CBM-20A	228-45012-41	1
送液ユニット	LC-20AD	228-45000-41	2
	LC-20AT	228-45001-41	1
オートサンプラ	SIL-20ACHT	228-43001-95	1
カラムオーブン	CTO-20AC	228-45010-31	1
PDA検出器※	SPD-M20A	228-45005-31	1
高圧切替バルブ	FCV-12AH	228-45013-91	2
低圧切替バルブ	FCV-13AL	228-45016-91	1
オンライン脱気ユニット	DGU-20A5R	228-45019-41	1
サブコントローラVP		228-35308-91	1
ミキサー、SUS316L		228-45093-93	1
リザーバトレイ		228-45019-41	1
PCセット	LCsolution Multi-PDA	223-61313-91	1
インラインフィルタ（オプション品）	インラインフィルタ 5UM	228-41748-91	1
	インラインフィルタ 2UM	228-41748-93	1

※検出器は蛍光、MSなど他の検出器との併用／置換えが可能です。
専用ソフトウェアTP-Assistの入手方法については、営業課へお問い合わせください。

本システムでは比較的、疎水性の大きな化合物を水サンプルから濃縮抽出するという操作を想定していますので、前処理カラム、分析カラムとも逆相系の組み合わせが標準的です。前処理カラムのサイズが小さいほど、濃縮効果が大きくなりますが、大量濃縮の場合、回収率も懸念されます。また、水サンプルですのでシリカ系前処理カラムは劣化が早まる可能性もあります。前処理カラムとしては、（株）ケムコプラス製 mdp-410、mdp-430など、ポリマーベースの疎水性カラムが好適です。河川水、湖沼水などをサンプルにする際にはフミン質除去効果のある同社製MASK-ENV（4 mm I.D.×10 mmL.または4 mm I.D.×30 mmL.）が効果的です。分析カラムとしては、カラム外拡散の効果がある程度認められますので、セミミクロからコンベンショナルスケールの逆相カラム（内径2～4.6 mm）をご使用になることをおすすめします。

MS JAB CM021
ISO 14001 JACO EC97J1031 UKAS MANAGEMENT SYSTEMS 051
本社地区事業所認証取得

株式会社 島津製作所

トラブル解消のため補修用部品・消耗品は純正部品をご採用ください。
外観および仕様は改良のため、予告なく変更することがありますのでご了承ください。

分析計測事業部 604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1

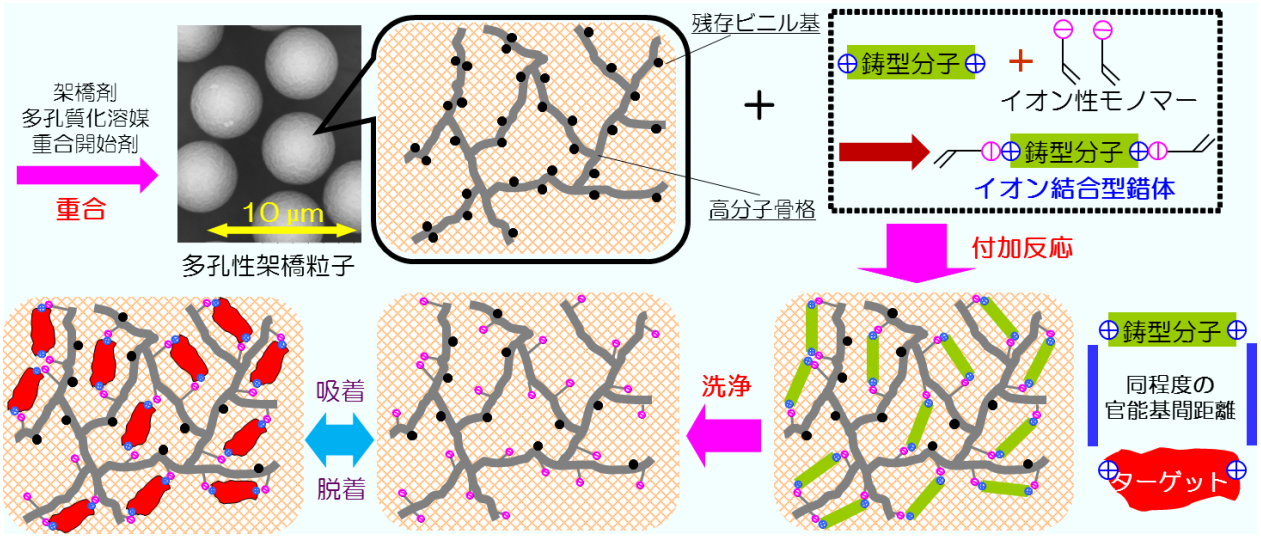
東京支社 101-8448 東京都千代田区神田錦町1丁目3 (03)3219-(官公庁担当) 5631・(大学担当) 5616・(会社担当) 5685
関西支社 530-0012 大阪市北区芝田1丁目1-4 阪急ターミナルビル14階 (06)6373-(官公庁・大学担当) 6541・(会社担当) 6556
札幌支店 060-0807 札幌市北区北七条西2丁目8-1 札幌北ビル9階 (011)700-6605
東北支店 980-0021 仙台市青葉区中央2丁目9-27 プライムスクエア広瀬通12階 (022)221-6231
郡山営業所 963-8877 郡山市堂前町6-7 郡山フコク生命ビル2階 (024)939-3790
つくば支店 305-0031 つくば市吾妻3丁目17-1 (029)851-(官公庁・大学担当) 8511・(会社担当) 8515
北関東支店 330-0843 さいたま市大宮区吉敷町1-41 明治安田生命大宮吉敷町ビル8階 (048)646-(官公庁・大学担当) 0095・(会社担当) 0081
横浜支店 220-0004 横浜市西区北幸2丁目8-29 東武横浜第3ビル7階 (045)312-(官公庁・大学担当) 4421・(会社担当) 311-4615
静岡支店 422-8062 静岡市駿河区稲川2丁目1-1 伊伝静岡駅南ビル2階 (054)285-0124
名古屋支店 450-0001 名古屋市中村区那古野1丁目47-1 名古屋国際センタービル19階 (052)565-(官公庁・大学担当) 7521・(会社担当) 7531
京都支店 604-8445 京都市中京区西ノ京徳大寺町1 (075)823-(官公庁・大学担当) 1604・(会社担当) 1603
神戸支店 650-0033 神戸市中央区江戸町93 栄光ビル9階 (078)331-9665
岡山営業所 700-0826 岡山市北区磨屋町3-10 住友生命岡山ニューシティビル6階 (086)221-2511
四国支店 760-0017 高松市番町1丁目6-1 住友生命高松ビル9階 (087)823-6623
広島支店 730-0036 広島市中区袋町4-25 明治安田生命広島ビル15階 (082)248-4312
九州支店 812-0039 福岡市博多区冷泉町4-20 島津博多ビル4階 (092)283-(官公庁・大学担当) 3332・(会社担当) 3334

島津コールセンター（操作・分析に関する電話相談窓口） 0120-131691 (075)813-1691
http://www.an.shimadzu.co.jp/

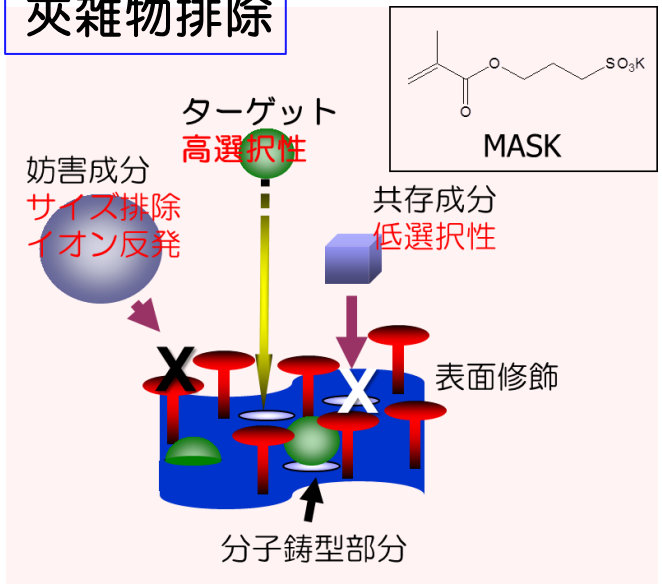
未来が変わる。日本が変える。
株式会社島津製作所はチャレンジ25キャンペーンに参加しています。
チャレンジ25

B-0806　擬似分子鋳型を用いた環境汚染物質の選択的捕捉技術の開発（京都府立大学）

疑似分子鋳型：官能基間距離固定化

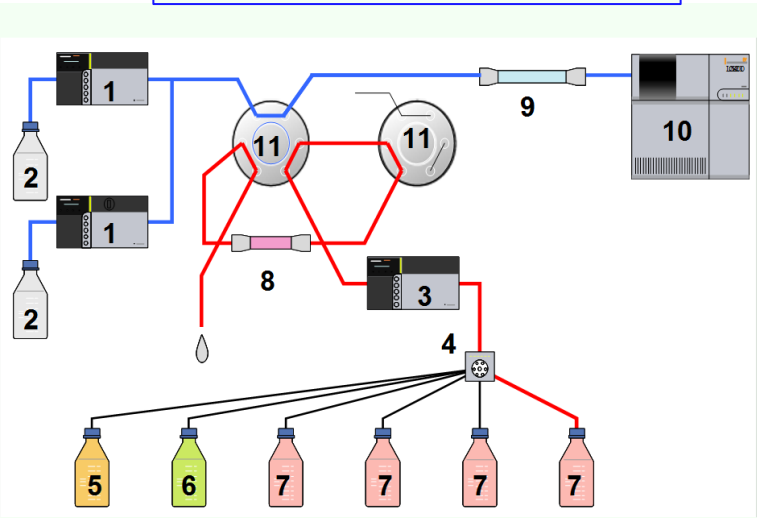


夾雑物排除



http://www.chemcoplus.co.jp/cn7/pg154.html

自動濃縮・高感度検出



オンラインカラムスイッチングシステムでの実試料前処理濃縮

（京都市内河川）